

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Sektion für Klinische Infektiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Untersuchung der Bedeutung von
Interleukin-10 für den Wirkmechanismus von
polymorphonuclear Myeloid-derived suppressor cells
(PMN-MDSC) in der chronischen HIV-1 Infektion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Euphemia Maria Plagge
aus Meppen
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rika Draenert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Uwe Koedel
Prof. Dr. med. Marcus Hentrich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Johannes Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2018

Inhalt

Zusammenfassung	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)	1
1.1.1 Geschichte	1
1.1.2 Aufbau und Struktur	2
1.2 Die akute HIV-Infektion	4
1.3 Die chronische HIV-Infektion	5
1.4 Das HI-Virus und das humane Immunsystem	6
1.4.1 CD8 T-Zellen	6
1.5 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	8
1.5.1 Historie, Definition und Phänotypen	8
1.5.2 Rolle im humanen Immunsystem	9
1.5.3 MDSC im höheren Lebensalter	10
1.5.4 Bedeutung bei Nicht-HIV-Erkrankungen	10
1.5.5 Rolle in der chronischen HIV-Infektion	11
1.6 Der Botenstoff Interleukin-10	12
1.6.1 Definition, Herkunft und Übersicht	12
1.6.2 Aufgaben von IL-10 im (gesunden) Organismus	12
1.6.3 Rolle von IL-10 in der chronischen HIV-Infektion	13
1.6.4 Bedeutung von IL-10 für MDSC	14
1.7 Das Zytokin Interferon- γ	15
1.8 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Chemikalien und Reagenzien	17
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.3 Software	19

2.4	Antikörper und Peptide	19
2.5	Medien	21
3	Methodik	22
3.1	Patientenkohorte	22
3.2	Versuchsablauf	25
3.3	Probenentnahme	25
3.4	PBMC-Isolierung aus Vollblut	26
3.5	Bestimmung der Zelldichte	27
3.6	Messung der IL-10 Produktion von PMN-MDSC	28
3.7	Auftauen von PBMC	28
3.8	CFSE Färbung der <i>target cells</i>	29
3.9	Separation von PMN-MDSC aus PBMC-Isolat	29
3.10	Überprüfung der Separation mittels Durchflusszytometrie	30
3.11	Ko-Inkubation von PMN-MDSC mit allogenen PBMC \pm IL-10-R α -AB . . .	30
3.12	Durchflusszytometrie	32
3.13	FACS-Analyse und Auswertungen	32
3.14	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für IL-10	36
3.15	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Keine bis sehr geringe spontane IL-10 Produktion durch PMN-MDSC <i>ex vivo</i>	38
4.2	Reproduktion der Proliferationshemmung durch PMN-MDSC	39
4.2.1	Unterschiede der Proliferation zwischen PHA und GagNef	40
4.2.2	Allgemeiner Einfluss durch Einsatz des IL-10-R α -ABs	41
4.3	Proliferationshemmung nach IL-10-R α Blockade teils reversibel	43
4.4	Reduktion der IFN γ Produktion nach Zugabe von IL-10-R α -AB	48
4.5	Erniedrigter IL-10 Gehalt nach Einsatz von IL-10-R α -AB	52
4.6	Absoluter IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen unterscheidet sich signifikant zwischen unspezifischer und spezifischer Stimulation	54
5	Diskussion	56
5.1	Patientenkohorte und Probenmaterial	56
5.2	Mögliche methodische Fehler und Schwächen der Arbeit	57
5.3	Produzieren PMN-MDSC selbst IL-10?	59
5.4	Bedeutung von IL-10 für die Funktion von PMN-MDSC bei HIV	60
5.5	IL-10 Verlust während Funktionsausübung durch PMN-MDSC	61

5.6 Klinische Bedeutung und Ausblick	61
Literaturverzeichnis	63
Anhang	75
Abbildungsverzeichnis	77
Tabellenverzeichnis	78
Patientenaufklärung	79
Veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit	85
Danksagung	87
Lebenslauf	88
Eidesstattliche Versicherung	89

Zusammenfassung

In der chronischen HIV-Infektion kommt es zu einer Abnahme der Funktion von verschiedenen Zellen des Immunsystems. Diese Entwicklung wurde mit Immunererschöpfung bezeichnet und führt zum Verlust der Kontrolle der Virämie und damit zum Krankheitsfortschritt. In den letzten Jahren wurde vor allem intensiv nach Ursachen dieser Immunererschöpfung gesucht. Darunter sind auch polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC), eine Gruppe unreifer Zellen der granulozytären Reihe, die bei chronisch HIV-Erkrankten durch Unterdrückung von T-Zell-Funktion zur progredienten Immundefizienz beitragen können. Interleukin-10 (IL-10) trägt zur negativen Regulation spezifischer Immunantworten bei und wird zum Teil für die Entstehung insuffizienter Immunreaktionen verantwortlich gemacht. Aufgrund von Expressionsprofilen von MDSC anderer Arbeitsgruppen postulierten wir, dass IL-10 für den Wirkmechanismus von PMN-MDSC in der chronischen HIV-Infektion verantwortlich ist.

Hierfür untersuchten wir die spontane IL-10 Produktion von PMN-MDSC von HIV-Patienten ex vivo per FACS-Analysen. Zudem separierten wir PMN-MDSC mit magnetischen Beads aus PBMC von Patienten mit chronisch fortschreitender HIV-Infektion (*effector*). Diese wurden mit PBMC von Patienten mit spontan kontrollierter HIV-Infektion (*target*) mit Wachstumsstimuli (PHA als unspezifische Stimulus und GagNef-Peptide als spezifischer Stimulus) und in An- und Abwesenheit eines IL-10-Rezeptor-blockierenden Antikörpers (IL-10-R α -AB) ko-inkubiert. Kriterien für die hemmende Wirkung der PMN-MDSC waren CD8 T-Zellproliferation und Interferon- γ Produktion.

Es stellte sich heraus, dass PMN-MDSC spontan ex vivo wenig IL-10 bildeten. In den Ko-Inkubationen fanden wir, wie vorbeschrieben, eine Hemmung der Proliferation und der Zytokinproduktion von CD8 T-Zellen durch Zugabe von PMN-MDSC. Bei der Verwendung des IL-10-R α -ABs zeigte sich eine signifikante Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit der CD8 T-Zellen, allerdings nur bei der unspezifischen, übermäßigen Stimulation mit PHA ($p = 0,03$). Bei der Stimulation mit den HIV-spezifischen Peptiden Gag und Nef konnte dies nicht erreicht werden. Die Interferon- γ Produktion

konnte bei beiden Stimulationsarten durch Zugabe des IL-10-R α -AB nicht auf das Vergleichsniveau gesteigert werden.

Wir schlussfolgern daher, dass IL-10 für die Funktion von PMN-MDSC keine Rolle spielt. Für die hemmende Funktion von PMN-MDSC sind also andere Wirkmechanismen anzunehmen. Da es sich bei PMN-MDSC um Zellen der granulozytären Reihe handelt, ist dies auch plausibel. Anders mag dies für monozytäre MDSC (M-MDSC) aussehen, eine weitere Subgruppe der MDSC, welche mit den Monozyten verwandt sind.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4 (8)	Cluster of Differentiation 4 (8)
CO	Controller
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
DC	Dendritic Cells
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
Gag	Group antigen
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HC	Healthy Control
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1
HLA	Human Leukocyte Antigen
HTLV-III	Human T-Lymphotropic Virus type III
IFN γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-10-R α -AB	Interleukin-10-Receptor Blocking Antibody
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells
- PMN-MDSC	- polymorphonuclear MDSC
- M-MDSC	- monocytic MDSC
MHC	Major Histocompatibility Complex
Nef	Negative factor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBMC-PMN-MDSC	PBMC-Rest nach Separation der PMN-MDSC
PHA	Phytohaemagglutinin
PR	Progressor
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
VL	Viruslast

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)

1.1.1 Geschichte

Das Humane Immunschwäche-Virus wurde erstmalig im Jahre 1983 am Institut Pasteur in Paris durch die Forschungsgruppe um Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier erfolgreich isoliert [1]. Da sie das Retrovirus in den Lymphknoten eines AIDS-Patienten entdeckt hatten, wurde es zunächst LAV (*Lymphadenopathie-assoziiertes Virus*) genannt. Kurze Zeit später publizierten Robert Gallo und sein Forscherteam vom *National Institute of Health* in Bethesda (Maryland, USA) die Entdeckung eines Retrovirus ebenfalls aus den Lymphknoten Erkrankter und nannten es HTLV-III (*Humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 3*), welches sich als ein und dasselbe Virus herausstellte [2]. Seit 1986 wird der Erreger nun einheitlich auf Empfehlung des *International Committee on Taxonomy of Viruses* als Humanes Immunschwächevirus (HIV) bezeichnet [1, 2]. Damit wurde derjenige Erreger entdeckt, welcher für das seit 1981 als eigenständige klinische Entität anerkannte und unter dem Namen AIDS (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) bekannt gewordene Immunschwächesyndrom verantwortlich gemacht worden ist.

Der früheste dokumentierte Fall eines mit HIV infizierten Menschen lässt sich auf eine eingelagerte Serumprobe von 1959 aus Kinshasa (Demokratische Republik Kongo) zurückführen [3]. Es wird angenommen, dass das Virus von Primaten, bei denen das verwandte *Simiane Immundefizienzvirus (SIV)* auftritt, auf den Menschen übertragen wurde. Weiterhin konnte durch Sequenzanalysen nachgewiesen werden, dass ein Transfer des HI-Virus 1 von Schimpansen und des HI-Virus 2 von Mangaben stattgefunden haben muss [4]. Dabei wird unter anderem der direkte Kontakt zu Blut oder Schleimhautsekreten der gejagten und erlegten Affen für die Übertragung verantwortlich gemacht [5].

Tatsächlich aufmerksam geworden war man auf diese Krankheit somit erst über 20 Jahre nach dokumentierter humaner Erstinfektion. In dieser Zeit wurden mehrere Berichte

über eine ungewöhnliche Häufung von bis dahin selten aufgetretenen Erkrankungen, wie Pneumocystis-Pneumonien (PCP) und Kaposi-Sarkomen, veröffentlicht. Diese sog. Indikatorkrankheiten für einen Immundefekt (auch: opportunistische Erkrankungen) traten in verschiedenen Staaten der USA vor allem bei zuvor gesunden Personen zwischen 15 und 60 Jahren auf - mit einer deutlichen Prävalenz unter homosexuellen Männern [6]. Aus diesem Grund entstand zeitweise die Annahme, dass die Immunsuppression eine Folge von Geschlechtskrankheiten oder Kontakt zu körperfremder Spermienflüssigkeit sei, wodurch Bezeichnungen wie *Gay Related Immune Deficiency (GRID)* aufkamen [7]. Gleichwohl haben diese in ihrer Zahl zunehmenden Berichte auch den Anlass zur intensiven Suche nach dem verursachenden Agens gegeben, welches, wie bereits erwähnt, wenige Jahre später erfolgreich identifiziert werden konnte. In demselben Jahr, in dem man sich auf den einheitlichen Namen HIV geeinigt hatte, wurde ein weiterer Typ des HI-Virus in westafrikanischen AIDS-Patienten entdeckt und erhielt den Namen HIV-2 [8]. Das zuerst entdeckte Retrovirus wurde nunmehr genauer als HIV-1 bezeichnet. HIV-1 und 2 sind phänotypisch nicht zu unterscheiden, allerdings besitzen sie einen genotypischen Unterschied von über 50%. Beide Viren verursachen eine ähnliche Symptomatik, wobei die Infektiosität und Pathogenität von HIV-2 als weitgehend milder beschrieben wird im Vergleich zu HIV-1 [9]. Global betrachtet werden die meisten AIDS-Fälle vom virulenteren HIV-1 verursacht. Im Jahr 2008 erhielt die französische Forschergruppe um Francoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier für ihre Entdeckung des HIV-1 den Nobelpreis für Medizin.

1.1.2 Aufbau und Struktur

Das Humane Immunschwächevirus gehört zur Familie der Retroviridae und ist der Gattung der Lentiviren zuzuordnen. Die Bezeichnung Retrovirus beinhaltet die Tatsache, dass bei dieser Virusfamilie im Gegensatz zu anderen Viruspopulationen, die RNA zunächst mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben werden muss, bevor diese in das Genom der Wirtszelle integriert und aktiv werden kann. Der Begriff Lentivirus hingegen leitet sich von lat. *lentus* = *langsam* ab, und nimmt Bezug auf das allmähliche Voranschreiten jener Krankheiten, die diese Viren verursachen [10].

Das Viruspartikel ist mit einem Durchmesser von 100 bis 120 nm relativ groß und von einer Doppellipidmembran umgeben. Diese entsteht durch Knospung des fertigen Viruskapsids aus der Wirtszelle und enthält daher neben den virusspezifischen externen und transmembranen Glykoproteinen gp120 (sog. Oberflächen- (engl. *surface*) Glykoprotein) und gp41 (sog. Hüll- (engl. *envelope*) Glykoprotein) auch Wirtszellproteine

wie HLA Klasse I und II Moleküle sowie Adhäsionsproteine. Ebenfalls in dieser Hülle enthalten sind die sog. *HIV-Spikes*, die einen Komplex aus je drei Molekülen gp120 in nichtkovalenter Bindung mit je drei Molekülen gp41 bilden. Das Glykoprotein gp120 ist besonders wichtig für die Bindung des Virus an die CD4-Rezeptoren von Zielzellen. An die Innenseite der Lipiddoppelschicht assoziiert befinden sich vor allem virale Matrixproteine, wie das Protein p17. Innerhalb dieser Hülle liegt das konische Viruskapsid, bestehend aus Kapsidproteinen, welches wiederum das virale Genom in Form zweier identischer Kopien einer einzelsträngigen RNA enthält. Zudem befinden sich hier zahlreiche Kopien aller essenzieller Enzyme, welche zur Produktion neuer Virusproteine für die ersten Schritte der Infektion und die Genomreplikation erforderlich sind. Darunter sind besonders die *Reverse Transkriptase*, welche die Virus-RNA in DNA umschreibt, und die *Integrase*, welche die virale DNA-Form in das Chromosom der Wirtszellen einfügt, hervorzuheben. Die Abbildung 1.1 gibt den schematischen Aufbau des HI-Virus wieder.

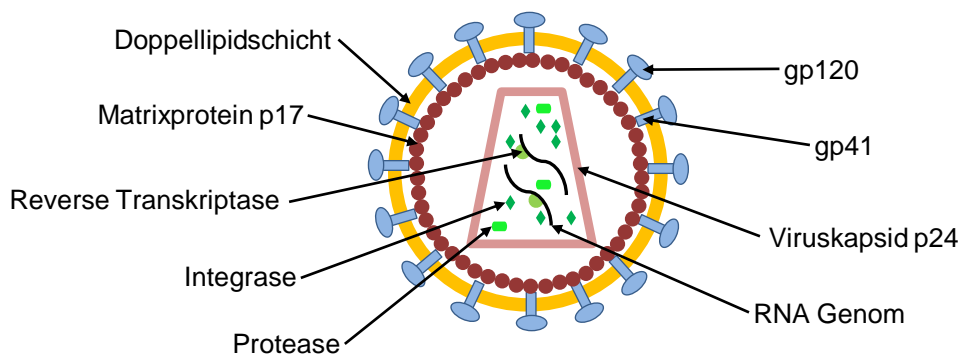


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des HIV-1 (angelehnt an [10]).

Insgesamt besteht das HIV-1 Genom aus 9 Genen: Den drei retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* und den sechs akzessorischen bzw. regulatorischen Genen *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*. In der Abbildung 1.2 ist der Aufbau des HIV-Genoms übersichtlich dargestellt.

Ein Peptid-Pool aus den Virusgenen *gag* und *nef* wurde für diese Arbeit als spezifische Stimulation zur Zellproliferation verwendet und findet in den nachfolgenden Kapiteln mehrmals Erwähnung [10, 11, 12].

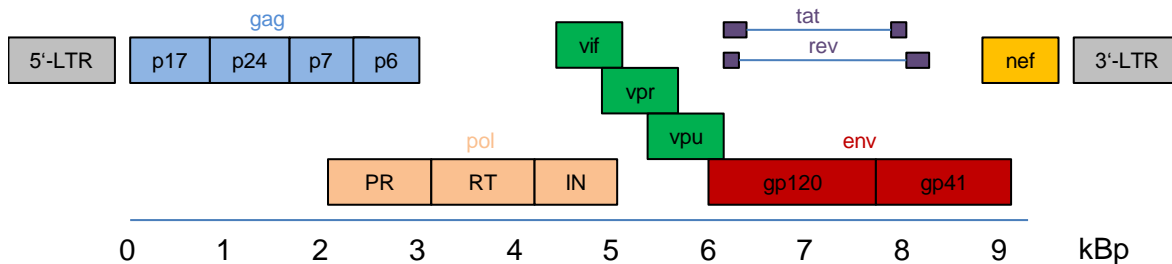


Abbildung 1.2: RNA-Genom von HIV-1 (angelehnt an [10].) Das Genom besteht aus insgesamt 9 Genen: gag (group specific antigen) mit p17 (Matrix-Protein), p24 (Capsid-Protein), p7 (Nucleocapsid-Protein) und p6 (Link-Protein); pol (polymerase) mit PR (Protease), RT (Reverse Transkriptase) und IN (Integrase); env (envelope) mit gp120 (surface-Protein) und gp41 (transmembrane-Protein) und den kleinen Genen vif (virion infectivity factor); vpr (viral protein r); vpu (viral protein u); tat (transactivation of transcription); rev (regulator of virion) und nef (negative factor).

1.2 Die akute HIV-Infektion

Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion lässt sich im Wesentlichen in drei Phasen unterteilen: Die **akute Phase**, die **asymptomatische** oder **Latenzphase** und die **symptomatische Phase**. Letztere wird als AIDS bezeichnet, da die Krankheit in der Regel in einem Syndromenkomplex endet, der durch das Auftreten opportunistischer Infektionen gekennzeichnet ist. Latenz- und symptomatische Phase lassen sich als *chronische HIV-Infektion* zusammenfassen. Speziell auf diese Phase soll mit Blick auf das Thema dieser Arbeit im nachfolgenden Kapitel 1.3 ausführlicher eingegangen werden.

Die akute HIV-Infektion umfasst einen Zeitraum von etwa 4-8 Wochen ab dem Zeitpunkt der Virus-Übertragung. Klinisch äußert sich diese Phase in 80% der Fälle als grippe-ähnliche Erkrankung oder durch unspezifische Symptome, sodass häufig versäumt wird die Diagnose der HIV-Infektion zu stellen. Im Blut des Patienten steigt in dieser Zeit die Viruslast (bezeichnet die Anzahl der HIV-RNA-Kopien pro Milliliter Plasma) massiv an. Während die CD4 T-Zellzahl zunächst deutlich abnimmt, kann sie sich nach Einsetzen der humanen Immunantwort wieder auf ein normales Niveau stabilisieren. Diese Immunantwort äußert sich unter anderem in der Aktivierung von CD8 T-Zellen (siehe Kapitel 1.4.1), die HIV-infizierte Zellen abtöten und letztlich die Viruslast wieder senken können. Am Ende dieser akuten Phase sind die Patienten wieder weitgehend beschwerdefrei und es schließt sich die Phase der Latenz an [10, 13, 14].

1.3 Die chronische HIV-Infektion

Asymptomatische Phase. In dieser auch als *klinische Latenz* bezeichneten Phase treten beim Patienten keine Beschwerden in Zusammenhang mit der HIV-Infektion auf. Diese Phase kann von sechs Monaten bis zu 20 Jahren oder noch länger andauern und endet mit der Entstehung erster opportunistischer Infektionen. In dieser Zeit gelingt es dem Immunsystem das HI-Virus weitgehend zu kontrollieren. Eine Viruselimination findet nicht statt. Die Anzahl der CD4 T-Zellen sinkt währenddessen in geringem Umfang. Studien zeigen einen CD4 T-Zellverlust im späteren Krankheitsverlauf von jährlich 50-100 Zellen pro Mikroliter [15]. Für diesen Prozess gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen werden die infizierten Körperzellen durch viruseigene Mechanismen direkt abgetötet. Zum anderen sind infizierte Körperzellen anfälliger zur Auslösung der Apoptose. Drittens werden virusbefallene Zellen durch zytotoxische CD8 T-Lymphozyten, die virale Peptide auf der Zelloberfläche detektieren, beseitigt [10, 16]. Gleichzeitig wurde in Studien gezeigt, dass der Prozess der Immunerschöpfung auch durch zunehmende Ineffektivität der CD8 T-Lymphozyten gekennzeichnet ist [17, 18, 19]. Auf diese Zellpopulation und ihre Bedeutung für das Immunsystem wird daher im gleichnamigen Kapitel 1.4.1 näher eingegangen.

Symptomatische Phase / AIDS. In dieser Phase befindet sich der Patient sobald erste opportunistische Erkrankungen auftreten. Zu den AIDS-definierenden Erkrankungen zählen unter anderem die Pneumocystis jirovecii-Pneumonie, Karposi-Sarkome und oropharyngeale Candidiasis. Diese entstehen gehäuft bei einer CD4 T-Zellzahl im Plasma von $< 200/\mu\text{l}$. Heutzutage tritt das Vollbild AIDS (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) überwiegend auf, wenn bei fehlender Diagnosestellung keine Therapie mit HAART (engl. *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) erfolgt oder Therapie-Incompliance vorliegt.

Fälle von AIDS und AIDS-assoziierten Sterbefällen spielen auch heute eine große Rolle, da es global gesehen eine hohe Anzahl noch untherapierter HIV-Infizierter gibt. UNAIDS veröffentlichte für das Jahr 2015 Daten über noch rund 22 Mio. ohne Therapie lebende Menschen weltweit. Die geographische Verteilung weist dabei hochgradige Unterschiede auf. AIDS-assoziierte Todesfälle betreffend ist in West-, Zentraleuropa und Nordamerika zusammengekommen die Zahl von 2000 bis 2014 um 12% gesunken, im Mittleren Osten und Nordafrika hat sich diese Zahl in demselben Zeitraum mehr als verdreifacht [20]. Diese und weitere Fakten bekräftigen die Dringlichkeit sowohl breiter Aufklärung, als auch auf lange Sicht eine Heilung der HIV-Infektion zu erreichen.

Abbildung 1.3 veranschaulicht den gesamten qualitativen Verlauf der HIV-Infektion ohne Einsatz einer HAART.

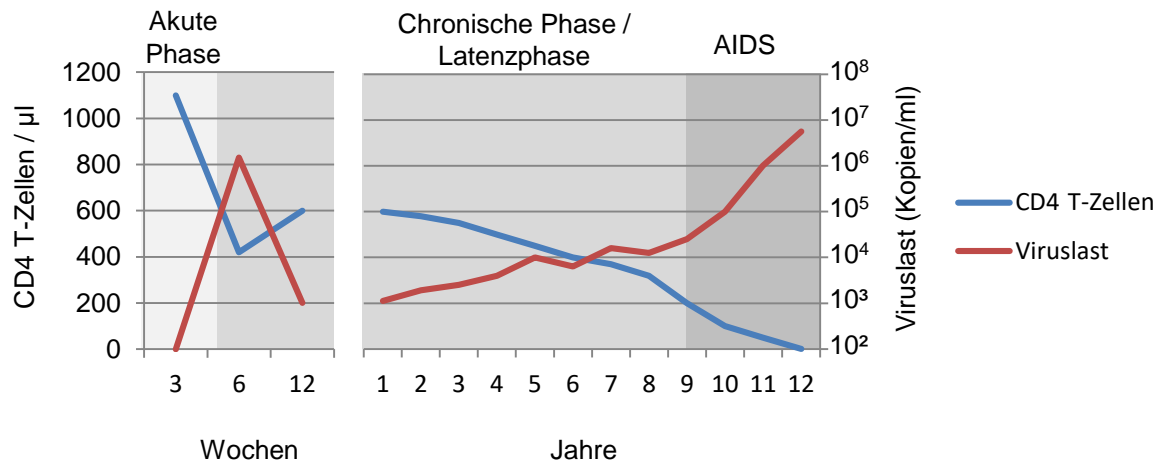


Abbildung 1.3: **Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie** (angelehnt an [21] und [22].)

1.4 Das HI-Virus und das humane Immunsystem

Allgemein stellen chronische Infektionen den dauerhaften Kampf zwischen Erregerantigen-Persistenz und der Immunantwort des Organismus dar. Der Körper muss stets neue Immunzellen rekrutieren, jedoch kommt es zu keiner vollständigen Erregerelimination [23, 24]. Am Beispiel der weit verbreiteten Infektion mit Herpesviren (HSV-1) wird deutlich, dass es dem immunkompetenten Organismus durchaus gelingen kann, eine chronische Infektion ausreichend zu kontrollieren. Im Rahmen des HIV zeichnet sich diese Infektion in den allermeisten Fällen jedoch durch das Unvermögen der Viruskontrolle durch das Immunsystem aus.

1.4.1 CD8 T-Zellen

Eine wichtige Komponente des Immunsystems hinsichtlich chronischer, viraler Infektionen stellen die CD8 T-Zellen (auch zytotoxische T-Zellen) dar. Ihre Bezeichnung bezieht sich dabei auf das Oberflächenprotein CD8 (engl. *Cluster of Differentiation 8*), welches sie auf ihrer Zelloberfläche tragen. Die CD8 T-Zellen entstammen der lymphatischen

Zellreihe und vollziehen nach Verlassen des Knochenmarks ihre Reifung im Thymus. Ihre Aufgabe besteht im Wesentlichen darin Zellen abzutöten, die mit einem Virus bzw. einem Pathogen infiziert sind. Die Virusantigene werden auf der Oberfläche der befallenen Wirtszelle präsentiert und von spezifischen CD8 T-Zellen erkannt.

Bereits wenige Jahre nach der Entdeckung des HI-Virus wurden von zwei Forschungsgruppen zytotoxische T-Zellen beschrieben, die fähig sind HIV zu eliminieren [25, 26]. Seither wurde klar, dass HIV-spezifische CD8 T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Virämie spielen. Jedoch trägt ihre progrediente Dysfunktionalität im Laufe der chronischen HIV-Erkrankung zum Fortschreiten der Erkrankung und damit zum Eintreten in das Stadium AIDS bei. Dabei wurde einerseits nachgewiesen, dass die Proliferationsfähigkeit virusspezifischer CD8 T-Zellen im Laufe der Infektion abnimmt [27]. Dies galt besonders für die CD8 T-Zellen von HIV-Progressoren, welche niedrige CD4 T-Zellzahlen und hohe Viruslasten aufweisen, (siehe Kapitel 3.1) im Vergleich zu den CD8 T-Zellen von HIV-Controllern, die meist hohe CD4 T-Zellen und eine niedrige Viruslast besitzen [28]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass in späteren Krankheitsstadien die CD8 T-Zellantworten insgesamt ineffektiver werden [17]. Insgesamt ist die Funktionalität HIV-spezifischer CD8 T-Zellen sehr komplex. Betts et al. wiesen HIV-spezifische T-Zellantworten unter anderem über Mediatoren wie CD107a, $\text{IFN}\gamma$, $\text{MIP-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ und IL-2 nach. Die Polyfunktionalität der CD8 T-Zellen war auch in diesem Fall insgesamt stärker bei HIV-Controllern im Vergleich zu HIV-Progressoren nachzuweisen und es zeigten sich quantitative Unterschiede in der Gewichtung der verschiedenen Zellmediatoren [18].

Die genaue Ursache für die zunehmende Dysfunktionalität der CD8 T-Zellen ist bisher nur teilweise geklärt. Neben der Erkenntnis, dass unter anderem inhibitorische Signalwege über das PD-1 Protein (engl. *Programmed Cell Death Protein 1*) relevant sind, spielen immunsuppressiv wirkende Zellpopulationen eine wichtige Rolle. Hier seien besonders die *Myeloid-derived suppressor cells* (kurz: MDSC) genannt, auf welche diese Forschungsarbeit fokussiert und im Folgenden ausführlicher eingegangen wird [10, 29].

1.5 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

1.5.1 Historie, Definition und Phänotypen

MDSC sind zum ersten Mal in den späten 1970er Jahren beschrieben worden. Zunächst wurden sie unter der Bezeichnung *Natural Suppressor Cells (NS)* und aufgrund ihrer Fähigkeit proliferative Immunantworten von T-Helfer-Lymphozyten gegenüber Mitogenen oder Alloantigenen zu inhibieren, bekannt [23, 30]. In den folgenden 20 Jahren ebte das Interesse an MDSC wieder ab, und erst in den späten 1990er Jahren fand eine Wiederentdeckung durch zwei voneinander unabhängig agierende Arbeitsgruppen statt [31, 32, 33]. Seitdem ist die Bedeutsamkeit dieser Zellpopulation für die Regulation des Immunsystems stark gewachsen und MDSC sind wieder fester Bestandteil der Forschung geworden. Ein Großteil der aktuellen Forschung und auch die Anfänge der MDSC Forschung fanden am Mausmodell statt. Dies erschwert insbesondere durch die unterschiedliche phänotypische Charakterisierung von Maus- zu humanen MDSC Rückschlüsse auf ihr Vorkommen und ihre Wirkmechanismen in den verschiedensten (Krankheits-)Settings im humanen Organismus [34, 35].

Die MDSC sind eine heterogene Gruppe unreifer Immunzellen myeloiden Ursprungs. Sie treten besonders bei Tumorerkrankungen, während Inflammationen und Infektionen auf und besitzen die Fähigkeit T-Zell-Immunantworten zu supprimieren. Sie werden vielfach als einzigartige Komponente des Immunsystems beschrieben, die es ermöglicht spezifische Immunantworten sowohl in gesunden Individuen als auch bei den unterschiedlichsten Krankheitsbildern zu regulieren [36]. Außerdem sind Effekte auf unspezifische Immunantworten ebenfalls durch Modulation der Zytokinproduktion von Makrophagen beschrieben, was die Komplexität der Wirkmechanismen von MDSC wiederum unterstreicht [37]. Trotz ihres heterogenen Erscheinungsbildes lassen sich einige gemeinsame Charakteristika der MDSC bestimmen: Zum einen mangelt es ihnen an der Expression spezieller Oberflächenmarker reifer Myeloidzellen. So exprimieren sie das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR nicht oder nur in sehr geringer Zahl. Darüber hinaus besitzen sie hohe Level sog. Reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species, ROS*) und anderer Moleküle wie Arginase 1 (Arg1) oder Stickstoffmonooxid-Synthasen (engl. *inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS*), die als wichtiger Bestandteil zur Ausübung ihrer inhibitorischen Funktion vielfach, insbesondere für PMN-MDSC, beschrieben sind [31, 38, 39].

Nachdem PMN-MDSC lange uneinheitlich benannt und charakterisiert wurden, wie zum Beispiel als *granulozytäre MDSC* oder *polymorphonuclear-like MDSC* (auch

PMN-MDSC) [40, 41, 42], publizierten Bronte et al. im Jahr 2016 eine Empfehlung zur einheitlichen Bezeichnung als *polymorphonuclear* MDSC (PMN-MDSC), welche auch in dieser Arbeit verwendet wird [43]. Im Allgemeinen werden die humanen MDSC als $CD11b^+/CD33^+/HLA-DR^{-/low}$ phänotypisiert, M-MDSC sind zudem als $CD14^+/CD15^{-/low}$ und PMN-MDSC als $CD14^{-/CD15^+}$ charakterisiert. Von dieser Phänotypisierung wird ebenfalls in dieser Arbeit Gebrauch gemacht, um die zu untersuchenden PMN-MDSC zu identifizieren. Es ist anzumerken, dass bei der Darlegung der folgenden Sachverhalte über MDSC noch keine Differenzierung zwischen PMN-MDSC und M-MDSC gemacht wurde, was insbesondere der uneinheitlichen Klassifizierung dieser Zellen zwischen den einzelnen Forschungsgruppen und je nach Krankheitsbild geschuldet ist.

1.5.2 Rolle im humanen Immunsystem

Im gesunden Organismus differenzieren unreife myeloide Zellen (engl. *Immature Myeloid Cells*, *IMC*) aus dem Knochenmark schnell zu reifen Granulozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen und sind folglich nur in sehr geringem Ausmaß im peripheren Blut auffindbar. Man geht insgesamt von einem Anteil von etwa 0,5% aller PBMC (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) aus [31]. Unter pathologischen Bedingungen hingegen, wie Tumorerkrankung [44, 45], Infektionen, Sepsis [46], aber auch bei Traumata [47], (Knochenmark-)Transplantationen [48, 49] oder Autoimmunerkrankungen [50] scheint dieser Reifungsvorgang jedoch unterbrochen zu sein, was in dem Auftreten und der Expansion jener unreifen myeloiden Zellpopulation, den MDSC, resultiert [36, 51].

Trotz der Tatsache, dass humane MDSC vor allem im Rahmen von Tumorerkrankungen umfangreich beschrieben worden sind, gibt es Hinweise auf ihre physiologische Rolle im gesunden Organismus. Dies bezieht sich beispielsweise auf harmlose Pathogene, denen der Körper täglich ausgesetzt ist. Ohne Begrenzung der Immunantwort könnte ein als ungefährlich deklariertes Fremdantigen eine zu starke immunologische Reaktion hervorrufen. Insbesondere bei Inflammationsreaktionen ist beschrieben, dass MDSC durch ihren inhibitorischen Einfluss auf zahlreiche immunologische Signalwege hilfreich sein können, um überschießende Immunantworten, die für den Körper mehr Schaden als Nutzen bedeuten können, zu begrenzen [23, 52, 53].

Folglich scheinen MDSC eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Unversehrtheit des Organismus infolge kleinerer Immunreaktionen, der Herstellung eines geord-

neten Ablaufs von immunologischen Prozessen und der Schadensbegrenzung bei exzessiven Immunantworten zu spielen.

1.5.3 MDSC im höheren Lebensalter

In der Literatur sind mehrfach Assoziationen zwischen der Anhäufung von MDSC im Blut und dem erhöhten Lebensalter beschrieben.

Im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (19 - 59 Jahre) fand die Arbeitsgruppe Verschoor et al. heraus, dass die Anzahl von PMN-MDSC sowohl in der Altersgruppe selbständig lebender Senioren zwischen 61 - 76 Jahren als auch von gebrechlichen älteren Menschen zwischen 67 - 99 Jahren signifikant erhöht ist. Außerdem fand sich eine höhere MDSC-Zahl im Blut der Senioren mit Krankheits hintergrund (vor allem Tumorerkrankungen in Remission). Dieser Aspekt legt neben dem erhöhten Lebensalter wiederum die Korrelation von Erkrankungen in Verbindung mit dem Ausreten von MDSC nahe. Nicht eindeutig geklärt werden konnte demnach, ob die Höhe des Lebensalters die Anzahl von MDSC im Blut bedingt, ob das vermehrte Auftreten von Krankheiten mit steigendem Alter diese Zellen mobilisieren oder gar die wachsende MDSC-Zahl erst die Entstehung von Erkrankungen hervorruft [54].

1.5.4 Bedeutung bei Nicht-HIV-Erkrankungen

Myeloid-derived suppressor cells wurden initial bei Tumorerkrankungen entdeckt und erforscht. Darüber hinaus sind sie mittlerweile als wichtige Mitspieler auch in zahlreichen weiteren Erkrankungen wichtiger Gegenstand der Forschung: Neben ihrer Rolle bei den Autoimmunkrankheiten [50, 55–62], in der Ontogenese [63, 64, 65] und bei Transplantationsreaktionen [30, 66–70] soll in diesem Kapitel aus Platzgründen nur kurz auf ihre Bedeutung im Tumorsetting und im Rahmen einer weiteren wichtigen Infektionskrankheit, der Hepatitis C, eingegangen werden.

Tumore. Es ist beschrieben, dass MDSC unter anderem direkt durch von Tumorzellen synthetisierte Faktoren, welche die Myelopoese fördern und Myeloidzellreifung inhibieren, aktiviert werden. Es handelt sich insbesondere um $\text{IFN}\gamma$ (siehe Kapitel 1.7), IL-4, IL-13 und $\text{TGF}\beta$. Allgemein werden MDSC im Tumorsetting vorwiegend nicht-immunologische Funktionen wie die Förderung der Tumor-Angiogenese und Metastasierung durch Produktion von VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), bFGF (engl. *basic Fibroblast Growth Factor*), MMP6 (engl. *Matrix-Metalloprotease 6*) und

weiteren Mediatoren zugeschrieben [36, 38, 71]. Außerdem ist bekannt, dass MDSC bereits vor erfolgter Tumormetastasierung die Bildung einer sogenannten prämetastatischen Nische im Gewebe fördern und das Wachstum von Metastasen begünstigen [72, 73]. Dabei sind sie Teil einer Tumormikroumgebung, die aus regulatorischen T-Zellen (Tregs) [74, 75], MDSC und dysfunktionalen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) [76] besteht, welche gemeinsam eine Art suppressives Tumornetzwerk bilden [77]. Wichtig ist hierfür unter anderem ein direkter Zell-Zell-Kontakt, was durch Hoechst et al. am Beispiel des Hepatozellulären Karzinoms beschrieben wurde [44]. Somit lässt sich ein Zusammenhang der MDSC mit Tumorprogression und einem negativen Einfluss auf das Patienten-Outcome herstellen.

Hepatitis C. Neben HIV bildet die Hepatitis C eine weitere infektiöse Viruserkrankung, bei der MDSC beschrieben wurden, ihre Rolle allerdings umstritten ist. Nonnenmann et al. konnten im Blut von Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion (cHEP-C) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen keinen signifikanten Anstieg von MDSC (polymorphonukleär und monozytär) feststellen. Zudem besaßen die PMN-MDSC von cHEP-C Patienten lediglich eine ähnlich hemmende Funktion wie jene gesunder Kontrollen [78].

1.5.5 Rolle in der chronischen HIV-Infektion

Vollbrecht et al. gelang im Jahre 2012 erstmals der Nachweis, dass HAART-naive HIV-Infizierte signifikant höhere Mengen an PMN-MDSC im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Probanden besitzen. HIV-Controller hingegen, die ihre Infektion eigenständig begrenzen können, zeigten deutlich niedrigere MDSC-Zahlen als Patienten mit progressivem Verlauf. Ebenso ergab sich eine negative Korrelation zwischen CD4 T-Zellzahl und MDSC im peripheren Blut. Nach Beginn einer HAART reduzierte sich die nachweisbare MDSC-Zahl rapide [29]. Tumino et al. konnten bei cART-behandelten Patienten keine Korrelation mehr zwischen PMN-MDSC und CD4 T-Zellzahlen oder der Viruslast finden, wiesen aber eine inverse Korrelation zwischen PMN-MDSC und IFN γ -produzierenden CD8 T-Zellen nach [79]. Korrespondierende Untersuchungen an SIV-infizierten Makaken zeigten interessanterweise ein Fortbestehen von PMN-MDSC auch während der cART und eine signifikante Expansion der Zellen nach Unterbrechung der Therapie. Auch hier wurde eine Korrelation zwischen PMN-MDSC und zirkulierenden inflammatorischen Zytokinen, sowie die Unterdrückung von CD4 und CD8

T-Zellantworten durch PMN-MDSC nachgewiesen [80]. Garg et al. dokumentierten eine Induktion der MDSC-Expansion durch das HIV-1 Glykoprotein gp120 über IL-6-Signalwege [34]. Diesbezüglich zeigten Wang et al. jüngst, dass unter anderem gp120 über STAT3-Signalwege die Myeloidzellreifung verhindert [81].

Es wird deutlich, dass innerhalb der chronischen HIV-1 Infektion die Rolle und Wirkmechanismen von MDSC noch nicht komplett verstanden sind und eine differenzierte Betrachtungsweise erforderlich ist.

1.6 Der Botenstoff Interleukin-10

1.6.1 Definition, Herkunft und Übersicht

Interleukin-10 (kurz: IL-10, engl. *Cytokine-synthesis inhibitory factor, CSIF*) gehört zu den Zytokinen aus der Gruppe der Interleukine. IL-10 ist ein Peptidhormon, welches aus 160 Aminosäuren aufgebaut ist, als Homodimer vorliegt und an die Zellrezeptoren IL-10-R α und IL-10-R β c binden kann [10]. Entdeckt wurde dieser Botenstoff erstmals 1989 als ein von Th2-Zellen produziertes Protein, das die Zytokinsynthese in Th1-Zellen von Mäusen hemmt [82]. Nachfolgende Studien zeigten, dass IL-10 ein weitaus größeres Aufgabenspektrum besitzt, wobei PBMC die wichtigsten Zielzellen zu sein scheinen. Darunter sind insbesondere Monozyten und ferner CD4 T-Zellen zu nennen [83, 84]. Allgemein werden IL-10 heutzutage vor allem stark immunsuppressive und entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben, womit es eine zentrale Rolle bei der Begrenzung der körpereigenen Immunantwort gegenüber Pathogenen spielt, um eigene Zellschäden zu vermeiden und die Gewebe-Homöostase aufrecht zu erhalten [85].

Wenngleich Daten vorliegen, dass IL-10 in geringem Ausmaß von nahezu allen Leukozyten produziert wird, bilden T-Helfer-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen die Hauptproduktionsquellen. Darüber hinaus wird bestimmten weiteren Zellgruppen wie B-Zellen, Mastzellen oder Granulozyten die Fähigkeit zugeschrieben in bestimmten Situationen IL-10 bilden zu können [85, 86].

1.6.2 Aufgaben von IL-10 im (gesunden) Organismus

Interleukin-10 gehört zusammen mit TGF β zu den wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokinen des Organismus und ist ebenso bedeutsam für die Entwicklung der natürli-

chen Immuntoleranz. Allgemein besitzt IL-10 hemmenden Einfluss auf T-Zell-Antworten, indem es die Produktion von IL-2, $\text{TNF}\alpha$ und IL-5 durch T-Zellen unterdrückt. Indirekt geschieht dies dadurch, dass IL-10 die Fähigkeit von APCs zur Antigenpräsentation supprimiert, indem es die Expression von Th1-Zell-Zytokinen, MHC-Klasse-I/II-Molekülen und co-stimulatorischen Faktoren (B7-1, B7-2) hemmt [10]. Außerdem supprimiert IL-10 die Produktion antagonistisch wirksamer, proinflammatorischer Faktoren wie $\text{IFN}\gamma$, IL-3, GM-CSF und anderen durch Makrophagen, Monozyten, dendritische und Helferzellen gebildeten Stoffen durch entsprechende Rezeptorbindung [87].

Diese lokale Begrenzung von Immunantworten ist zum Eigenschutz des Körpers wichtig und verhindert Überreaktionen. So bleiben beispielsweise Entzündungsreaktionen im Darm auf die Mukosa begrenzt, wobei ein IL-10 Mangel unter anderem das Auftreten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) fördern kann [88, 89, 90].

Neben den negativ-regulatorischen Funktionen von IL-10 besitzt dieses Zytokin allerdings auch positiv wirkende Fähigkeiten. Darunter fallen insbesondere die Stimulation von NK-Zellen, CD8 T-Zellen und die Induktion der B-Zell-Proliferation und folglich deren Antikörper-Produktion [83, 91].

1.6.3 Rolle von IL-10 in der chronischen HIV-Infektion

In der chronischen HIV-Infektion gibt es zahlreiche durch Studien belegte Hinweise darauf, dass IL-10 eine maßgebliche Rolle für den Krankheitsprogress und das Langzeit-Outcome spielt [19, 92]. Allgemein sind im Plasma von therapie-naiven HIV-1 Infizierten erhöhte IL-10 Spiegel messbar. Davon sind HIV-Controller (Kapitel 3.1) abzugrenzen, bei denen sich kein Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen zeigte. Der Einsatz einer HAART bewirkte den Abfall des Plasma IL-10 [16].

Des Weiteren wurde eine positive Korrelation zwischen IL-10 Gehalt und Viruslast im Plasma von chronisch HIV-Infizierten festgestellt [93, 94]. Von PBMC produziertes IL-10 ist dabei in der Lage die Proliferation, Zytokinproduktion und Aktivierung von CD4- und auch CD8 T-Zellen zu inhibieren, worin eine Beeinträchtigung des regulären Ablaufs der Immunreaktion resultiert [93, 95]. Eine gesteigerte IL-10 Produktion ist in der chronischen HIV-Infektion ebenfalls in Makrophagen und dendritischen Zellen messbar, wodurch es zu verminderter T-Zell-Stimulation kommt [96].

Weitere Studien postulierten die Assoziation erniedrigter IL-10 Spiegel mit verbesserter Viruskontrolle bei chronischer HIV-1 Infektion [97]. Antikörper-vermittelte Blockade von IL-10 führte zu einer signifikanten Rehabilitation virusspezifischer T-Zell-Immunantworten [16, 98].

Dennoch deutet auch vieles auf eine möglicherweise konträre Rolle von IL-10 in der chronischen HIV-Infektion hin. Aus Platzgründen wird an dieser Stelle auf entsprechende Quellen verwiesen [92, 97, 99, 100].

In Abbildung 1.4 sind die wichtigsten Funktionen von IL-10 zusammengefasst.

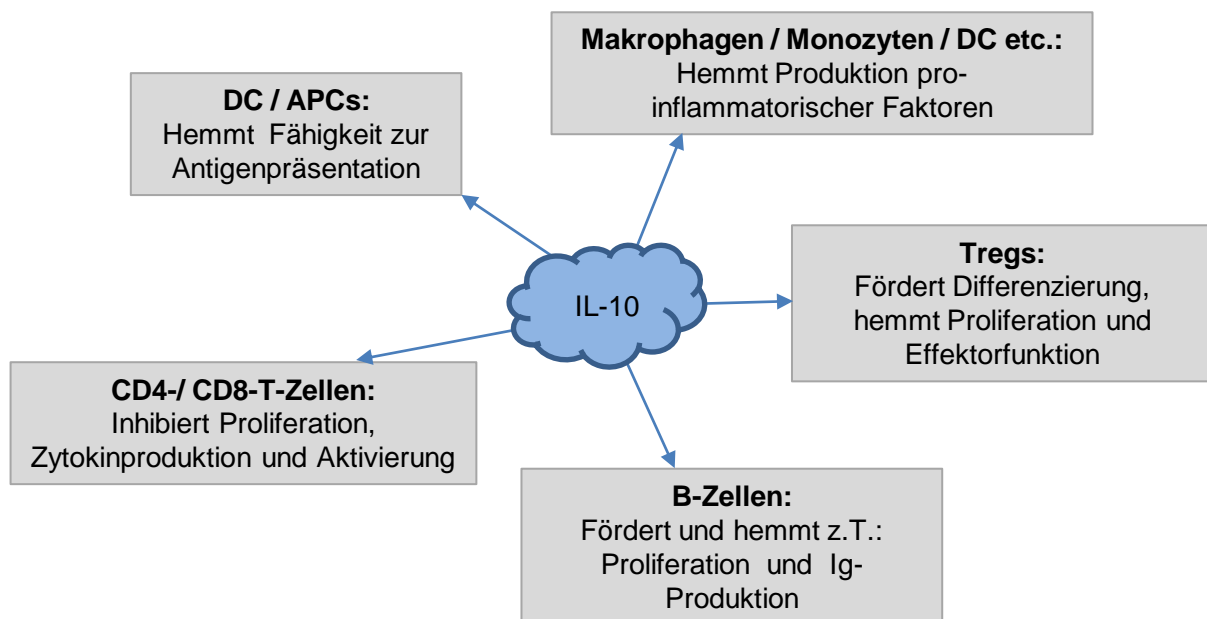


Abbildung 1.4: Übersicht der wichtigsten Funktionen von Interleukin-10. Aufgeführt sind die wesentlichen Zellpopulationen, auf die IL-10 Einfluss ausübt, wobei zum Teil kontroverse Funktionen zu nennen sind.

1.6.4 Bedeutung von IL-10 für MDSC

Im Rahmen von Tumorerkrankungen zeigen Studien, dass die Abwesenheit von IL-10 in Knockout-Mäusen mit erhöhten Spiegeln von MDSC im Tumorgewebe einhergeht. Auf die Funktion der MDSC selbst scheint IL-10 in diesem Zusammenhang allerdings keinen Einfluss zu haben. Hierbei wurde die hemmende Funktion der MDSC auf die T-Zell-Proliferation sowohl in Knockout- als auch in IL-10^{+/+} Mäusen nachgewiesen. Auch der Effekt des reduzierten Tumorstwachstums nach MDSC-Deletion (siehe Kapitel 1.5.4) zeigte keinen Zusammenhang mit der An- oder Abwesenheit von IL-10 [101]. Studien an Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) konnten darüber hinaus keine zelleigene Synthese von IL-10 durch CD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSC feststellen. Man fand allerdings heraus, dass diese MDSC in Ko-Kultivierung mit CD4 T-Zellen letztere zur

IL-10 Produktion stimulierten. Dieses synthetisierte IL-10 wiederum besaß proliferationshemmende Eigenschaften, was die Ko-Kultivierung von CD4⁺HLA-DR^{-/low} MDSC mit CD3/CD28-stimulierten CD4 T-Zellen unter Einsatz eines IL-10 neutralisierenden Antikörpers zeigte. Die Zugabe des Antikörpers ging in diesem Fall mit einer um 60% erhöhten Proliferationsrate der CD4 T-Zellen einher [44].

Hieraus wird deutlich, dass auch für IL-10 im Kontext mit MDSC keine einheitliche Aussage gemacht werden kann, sondern vieles noch unerforscht ist. Beide Komponenten scheinen offensichtlich je nach Krankheitsmodell, Vorkommen verschiedener Zelltypen und Zelltargets oder Phase der Immunantwort unterschiedliche Interaktionen miteinander eingehen zu können. Somit bleibt insbesondere im Rahmen der chronischen HIV-1 Infektion noch vieles ungeklärt und bietet Raum für intensivere Nachforschungen.

1.7 Das Zytokin Interferon- γ

Interferon- γ (kurz: IFN γ) ist ein weiteres für diese Arbeit wichtiges Zytokin, welches als Aktivitätsmarker von T-Zellen fungiert.

IFN γ wird den Interferonen zugeordnet und ist ein aus 143 Aminosäuren aufgebautes Glykoprotein, welches in seiner inaktiven Form als Homodimer vorliegt. Hauptproduzenten sind CD4-, CD8 T-Zellen und NK-Zellen. Die wichtigsten Effektorfunktionen von IFN γ sind die Aktivierung von Makrophagen, Induktion der Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems, Immunglobulin-Klassenwechsel und Hemmung von Th2-Zellen. Neben IL-2 ist IFN γ das wesentliche aktivierende Zytokin für zytotoxische CD8 T-Zellen. Es ist bekannt, dass IFN γ die Aktivierung von MDSC induziert [36, 102].

1.8 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

MDSC spielen in der Pathogenese der HIV-Infektion eine wichtige Rolle, genaue Kenntnisse zur Wirkungsweise sind bisher jedoch nicht untersucht. Dies ist Ziel der vorliegenden Arbeit. Hierbei beschränkten wir uns auf die PMN-MDSC und das inhibitorische Signalmolekül IL-10.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Produzieren PMN-MDSC Interleukin-10?
2. Wie wirkt sich die Blockade des IL-10-Rezeptors auf die hemmende Funktion der PMN-MDSC aus - gemessen an der Proliferationsfähigkeit und der Interferon- γ Produktion der CD8 T-Zellen?
3. Welchen Einfluss hat die IL-10 Blockade auf den Gehalt von IL-10 innerhalb der Zellkultur?

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Biocoll (Ficoll®)	Biochrom AG; Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich; Taufkirchen
CFSE (Fluoreszenzmarker)	BioLegend; San Diego, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA; Darmstadt
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck KGaA; Darmstadt
FBS Superior (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG; Berlin
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom AG; Berlin
Fixation Medium A	Invitrogen; Karlsruhe
Hanks' Salt Solution	Biochrom AG; Berlin
HEPES Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Kompensationspartikel-Set:	BD Biosciences; Heidelberg
- BD™CompBead Anti Mouse IgG, κ	
- BD™CompBead Anti Rat IgG, κ	
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA; Cölbe
Monensin (BD Golgi Stop™)	Becton Dickinson; Heidelberg
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich; Taufkirchen
PHA (Phytohaemagglutinin)	Sigma Aldrich; Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG; Berlin
Permeabilization Medium B	Invitrogen; Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	PAA; Cölbe
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG; Berlin
Selektions-Kit CD66b ⁺ Easy Sep™	STEMCELL Technologies; Köln
Tween-Lösung	Sigma Aldrich; Steinheim

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Combitips advanced 10 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Combitips plus	Eppendorf AG; Hamburg
Durchflusszytometer, FACSCalibur OS X	BD Biosciences; Heidelberg
Durchlichtmikroskop DIALUX 20 EB	Leitz; Wetzlar
Durchlichtmikroskop invers Leica DM IL	Leitz; Wetzlar
EasySep TM Magnet	STEMCELL Technologies GmbH; Köln
EDTA Monovette, KE/9 ml	Sarstedt; Nümbrecht
ELISA MAX TM Deluxe Set - Human IL-10	BioLegend; San Diego; USA
FACS-Rundbodenröhrchen	BD Biosciences; Heidelberg
Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene; Wiesbaden
Heizwasserbad, Modell 1083	GFL; Burgwedel
Inkubationsschrank, HeraCell [®]	Heraeus; Hanau
Kippschüttler Rocky, RT-1	Fröbel Labortechnik; Lindau
Laborautoklavier Typ 3850 EL	Tuttnauer; Breda, Niederlande
Latex-Einweghandschuhe Sempercare [®]	Semperit GmbH; Wien, Österreich
Microplate Reader GENios Pro	Tecan Trading AG; Männedorf; Schweiz
Mullkompresse Gazin	Lohmann&Rauscher; Neuwied
Nunc Kryo-Röhrchen 1,8 ml	Thermo Scientific; Langenselbold
Objektträger mit 10 Zählkammern	Hycor Biomedical Inc.; Garden Grove, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S reloads 50-125 µl	Eppendorf AG; Hamburg
Pipettenspitzen bis 20/200/1000 µl	Kuhnle GmbH; Karlsruhe
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS Integra Biosciences GmbH; Fernwald
Repetitive Pipette Multipette [®] plus	Eppendorf AG; Hamburg
Rundbodenröhrchen Polystyrol 5 ml	Falcon; New York, USA
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Serologische Einmalpipette 5 ml/ 10 ml	TTP; Ibbenbüren
Sterilwerkbank, Model Labgard 437 Class II, Type A2	NuAire Biological Safety Cabinets; Plymouth, USA
Sterilwerkbank, Safe 2010 Model 1.2	Heto-Holten; Allerød, Dänemark
Vortexgerät, Vortex-Genie [®] 2	IKA [®] Werke; Staufen
Zellkulturflasche, Filter	TPP; Ibbenbüren
Zellkulturplatte, 24-Loch	Becton Dickinson; USA
Zellzählsystem, CASY [®] 1 Model TT	Schärfe System; Reutlingen
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge, Sorvall Super T21	Thermo Scientific; Schwerte
Zentrifugenröhrchen 15 ml/ 50 ml	TPP; Ibbenbüren

2.3 Software

CellQuest Pro™ Software Version 6.0	Becton Dickinson; Heidelberg
FlowJo Version 7.2.1	Tree Star Inc.; Ashland; USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software; La Jolla; USA
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation; Redmond; USA
XFlour4 Software	Tecan Trading AG; Männedorf; Schweiz

2.4 Antikörper und Peptide

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antigen	Marker	Isotyp	Hersteller	je 10 ⁶ Zellen
CD11b	FITC	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	10 μ l
CD14	APC	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
CD14	FITC	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	10 μ l
CD15	PerCP	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
CD33	PE	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
CD66b	PE	Mouse IgM, κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
HLA-DR	PerCP	Mouse IgG _{2a} , κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
CD8a	PerCP	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	1 μ l
IFN γ	APC	Mouse IgG ₁ , κ	BioLegend; San Diego (USA)	5 μ l
IL-10	APC	Rat IgG _{2a}	BD Pharmingen™, Heidelberg	1,5 μ l
IL-10 Iso*	APC	Rat IgG _{2a} , κ	BD Pharmingen™, Heidelberg	1,5 μ l
IL-10-R α	-/-	Mouse IgG ₁	R&D Systems, Minneapolis, USA	10 μ l

*Iso = Isotype Control

Alle Peptide wurden vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Potters Bar; England) bezogen.

Tabelle 2.2: Gag-Peptide

Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
1	MGARASVLSGGELDK	2	GELDKWEKIRLRPGG
3	LRPGGKKKYKLKHIV	4	LKHIVWASRELERFA
5	LERFAVNPGLLETSE	6	LETSEGCRQILGQLQ
7	LGQLQPSLQTGSEEL	8	GSEELRSLYNTVATL
9	TVATLYCVHQRIDVK	10	RIDVKDTKEALEKIE
11	LEKIEEEQNKSKKKA	12	SKKKAQQAAAAAGTG
13	AAGTGNSSQVSQNY	14	PIVQNLQGQMVHQAIISPTL
15	VHQAIISPTLNAWVKVVEEK	16	NAWVKVVEEKAFSPEVIPMF
17	AFSPEVIPMFSALESEGATPQ	18	SALSEGATPQDLNTMLNTVG
19	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLK	20	GHQAAMQMLKETINEEAAEW
21	ETINEEAAEWDRVHPVHAGP	22	DRVHPVHAGPIAPGQMREPR
23	IAPGQMREPRGSDIAGTTST	24	GSDIAGTTSTLQEQIGWMTN
25	LQEQIGWMTNPPPIPVGEIY	26	NPPIPVGEIYKRWIILGLNK
27	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI	28	IVRMYSPTSILDIRQGPKEP
29	LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK	30	FRDYVDRFYKTLRAEQASQD
31	TLRAEQASQDVKNWMTETLL	32	VKNWMTETLLVQNANPDCKT
33	VQNANPDCKTILKALGPAAT	34	ILKALGPAATLEEMMTACQG
35	LEEMMTACQGVGGPGHKARV	36	AEAMSQVTNPANIMM
37	ANIMMQRGNFNRNQRK	38	RNQRKTVKCFNCGKE
39	NCGKEGHIAKNCRAP	40	NCRAPRKKGCWRCGR
41	WRCGREGHQMKDCTE	42	KDCTERQANFLGKIW
43	LGKIWPSYKGRPGNF	44	RPGNFLQSRPEPTAPPE
45	EPTAPPEESFRFGEE	46	RFGEEKTPPQKQEPI
47	QKQEPIDKELYPLTS	48	YPLTSLRSLFGNDPSSQ

Tabelle 2.3: Nef-Peptide

Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
49	GGKWSKSSVVGWPTVRERMR	50	GGKWSKSSVVGWPTVRERMR
51	RAEPAADGVGAASRDLEKHG	52	AASRDLEKHGAITSSNTAAT
53	AITSSNTAATNAACAWLEAQ	54	NAACAWLEAQEEEEVGFPVT
55	EEEEVGFPVTPQVPLRPMTY	56	PQVPLRPMTYKAAVDLSHFL
57	KAAVDLSHFLKEKGGLEGLI	58	KEKGGLEGLIHSQRRQDILD
59	HSQRRQDILDWYHTQGYF	60	LWYHTQGYFPDWQNYTPGP
61	PDWQNYTPGPGVRYPLTFGW	62	GVRYPPLTFGWQCYKLPVEPD
63	CYKLPVEPDKVEEANKGEN	64	KVEEANKGENTSLLHPVSLH
65	TSLHHPVSLHGMDDPEREVL	66	GMDDPEREVLWRFD SRLAF
67	EWRFDSRLAFHHVARELHPE	68	HHVARELHPEYFKNC

2.5 Medien

R10:

RPMI 1640 Grundmedium (ohne L-Glutamin und Hepes) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml], 5 ml HEPES Puffer [1 M] und 50 ml FCS (hitzeinaktiviert, 1 h, 56°C); Bestell-Nr.: E15-039

Hanks:

Hanks' Grundmedium (Hanks' Balanced Salt Solution) (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) supplementiert mit 5 ml L-Glutamin [200 mM], 5 ml Penicillin [10.000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml] und 5 ml HEPES Puffer [1 M]; Bestell-Nr.: L 2055

PBS+:

PBS (Phosphate Buffered Saline, Bestell-Nr.: D8537) supplementiert mit 2% FCS (Fetal Calf Serum, hitzeinaktiviert, 1 h, 56°C) und 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Bestell-Nr.: 1.08418.0100)

3 Methodik

3.1 Patientenkohorte

In die für die vorliegende Arbeit konzipierte Studie wurden zur Untersuchung der PMN-MDSC HIV-1 positive, therapie-naive oder erst seit Kurzem in Therapie befindliche Patienten eingeschlossen. Diese besaßen im Wesentlichen Progressorstatus, also eine niedrige CD4 T-Zellzahl und eine erhöhte Viruslast. Die aus deren PBMC separierten PMN-MDSC wurden als *effector cells* bzw. *effector* bezeichnet. Als Zielzellen, mit deren Hilfe die PMN-MDSC-Wirkung verifiziert werden sollte, wurden HIV-Patienten verwendet, die zumeist ihre Krankheit ohne Einnahme einer HAART eigenständig kontrollieren konnten und von deren Zellen (PMBC) in unserem Labor bereits eine gute Proliferationsfähigkeit bekannt war. Diese werden im Folgenden als *target cells* bzw. *target* bezeichnet. Eine Ausnahme bildete CO 28, welcher trotz langjähriger HAART permanent hohe MDSC-Zahlen aufzuweisen hatte.

Die Patienten wurden ausschließlich aus der Infektionsambulanz der Sektion Klinische Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt, des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. Anhand einer Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung, die in einem persönlichen Gespräch mit einem zuständigen Arzt erläutert wurde, sind die Probanden ausführlich informiert und über eventuelle mit der Studie einhergehende Risiken (z.B. im Rahmen der venösen Blutentnahme) aufgeklärt worden (s. Anhang). Ihre Zustimmung zur Teilnahme wurde daraufhin schriftlich festgehalten, wobei die Probanden gleichwohl über ihr persönliches Rücktrittsrecht informiert wurden. Alle durchgeführten Untersuchungen sind im Voraus bei der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität eingereicht und genehmigt worden.

Insgesamt wurden 24 HIV-1 positive Patienten in die Studie eingeschlossen. Außerdem wurden 11 gesunde Probanden (*healthy controls*, HC) für Vergleichsmessungen rekrutiert. Allen Probanden wurde einmalig Blut entnommen und die jeweilige MDSC-Zahl

evaluiert. Es wurden die PBMC von insgesamt 6 HIV-1 positiven *targets* verwendet. Dabei wurde auf bereits vorhandene kryokonservierte Proben zurück gegriffen. Folglich wurden manche *target cells* für mehrere Assays mit verschiedenen *effectors* eingesetzt.

Eine detaillierte Übersicht der *target* und *effector cells* mit Angaben des HIV-Stadiums, der CD4 T-Zellzahl im Plasma und der Viruslast findet sich in der nachfolgenden Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht der target und effector cells für die Proliferationsassays und die Messungen zur IL-10 Synthese

Pat.-ID	HIV-Stadium	CD4 [1/ μ l]	VL [cp/ml]
¹ CO 04	A1	553	39.116
¹ CO 08	A2	489	126.332
¹ CO 41	A1	879	<50
¹ CO 44	A1	621	2.565
¹ PR 103	A2	452	5.250
¹ TR 61	A1	639	228
² TR 42	A2	321	< 50
² CO 28	C1	845	<50
² PR 28	C3	10	103.070
² M 89	A3	175	65.289
² M 92	A2	298	164.061
² M 95	A2	350	752.462
² M 97	C3	117	243
² M 99	C3	4	53.501
² M 100	C3	450	300
² M 101	A2	326	10.695
² M 102	A3	73	393.938
² M 103	A2	204	33.208
² M 104	C3	5	543
² M 106	B3	55	102.107
² M 107	C3	30	120.000
² M 108	A2	226	74.941
² M 109	C3	30	250.000
² M 115	A2	445	175.036

¹ = *target cells* bzw. *target*

² = *effector cells* bzw. *effector*

3.2 Versuchsablauf

In Abbildung 3.1 ist eine schematische Übersicht zum Ablauf der Experimentenreihe dieser Arbeit aufgezeichnet.

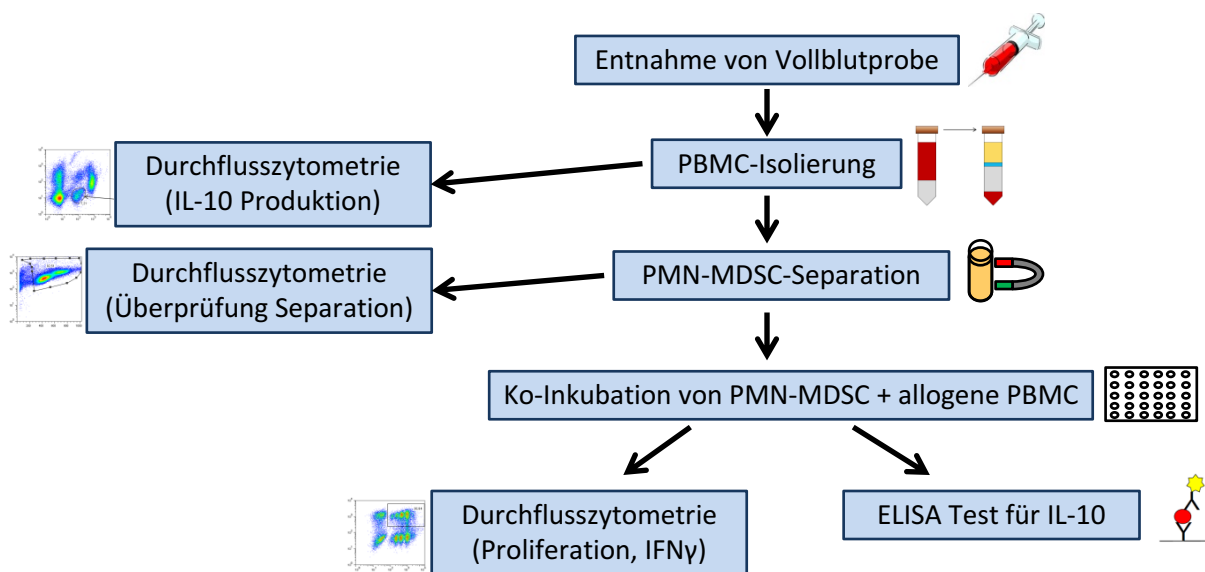


Abbildung 3.1: Übersicht der einzelnen Versuchsschritte.

3.3 Probenentnahme

Für die Entnahme des benötigten Vollblutes wurden die spätestens einen Tag zuvor aufgeklärten und in die Studie eingewilligten Probanden am Morgen desselben Bearbeitungstages einbestellt. Somit sollten längere Lagerungszeiten als mögliche beeinflussende Variable vermieden werden [103]. Es war dabei nicht erforderlich spezielle Maßnahmen, wie z.B. Nüchternheit, vor der Blutentnahme zu beachten. Durchschnittlich wurden zwischen 30-60 ml Vollblut (entspricht drei bis sechs EDTA-Röhrchen; je nach Hämoglobin- und Leukozytengehalt im Blut des Patienten) abgenommen.

3.4 PBMC-Isolierung aus Vollblut

Zunächst ist anzumerken, dass alle weiteren Methoden und Handlungsschritte unter sterilen Bedingungen erfolgten. Die experimentelle Arbeit fand in einem Labor mit gentechnischer Sicherheitsstufe 1 und Biologischer Schutzstufe 2 an einer sterilen Werkbank unter Einsatz ebenfalls steriler Reagenzien und Materialien statt.

Die PBMC wurden aus dem frisch entnommenen Vollblut mithilfe von Dichtezentrifugation auf Ficoll[®] isoliert. Mittels einer elektronischen Pipette wurde das mit Hanks verdünnte Vollblut mit 13 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen unterschichtet. Im Anschluss wurden die Zellpopulationen durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 30 min unter Ausschaltung der zusätzlichen Beschleunigung und Bremse voneinander separiert. Hierbei bildeten die Granulozyten und Erythrozyten als schwerste Komponenten den Bodensatz unterhalb der Ficollphase. Zwischen Ficoll und der obersten Plasmaphase, in der sich die leichten Thrombozyten befanden, sammelten sich in der sogenannten Interphase die Mono- und Lymphozyten. Die schematische Zeichnung 3.2 führt diesen Vorgang nochmals vor Augen.

Die nun separierten Lymphozyten und Monozyten wurden anschließend mit der Pipette abgenommen, in ein steriles 50 ml Gefäß übertragen und mit Hanks' Medium verdünnt. Da nicht vermieden werden kann, dass auch Plasma, Thrombozyten und Ficoll-Lösung teilweise mit überführt werden, wurde die Zellsuspension insgesamt in drei Durchgängen gewaschen (Zentrifugation: RT / 10 min / 1500 rpm bei nun voller Beschleunigung und Bremse). In den ersten zwei Waschvorgängen diente Hanks' Medium zur Verdünnung, als letztes wurde das abzentrifugierte Pellet in 10-20 ml R10 Medium resuspendiert.

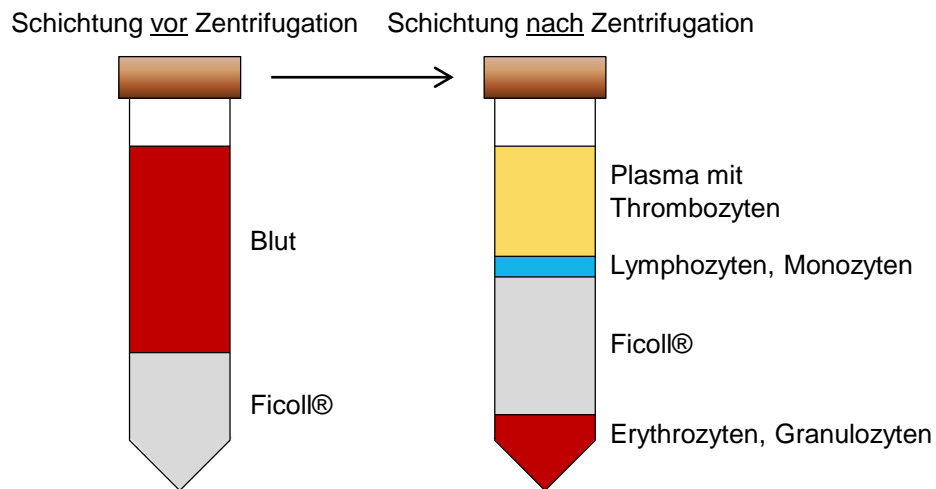


Abbildung 3.2: PBMC-Isolierung durch Dichtezentrifugation mithilfe von Ficoll®. Anhand der unterschiedlichen Dichteigenschaften der verschiedenen Zellpopulationen wurden diese durch Unterschichtung mit Ficoll® und anschließender Zentrifugation voneinander aufgetrennt.

3.5 Bestimmung der Zelldichte

Im Anschluss an die PBMC-Isolation wurde die Menge der gewonnenen Zellen bestimmt. Dafür diente das automatische Zählssystem CASY® 1 Modell TT der Schärfe System GmbH. Für die Messung werden standardmäßig 50 µl Zellmedium in 10 ml CASYton resuspendiert. CASYton ist ein isotonischer Messpuffer aus physiologischer Kochsalzlösung, der unter anderem verhindert, dass die einzelnen Zellen ihre Größe und Form verlieren. Das Ergebnis wird daraufhin in der Einheit 1×10^6 Zellen/ml angegeben.

Von diesen zuvor isolierten PBMC wurden etwa $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen entweder für die Überprüfung der Separation von PMN-MDSC (siehe Kapitel 3.10) beiseitegelegt und in 200 µl R10 Medium bei 37°C inkubiert, oder für die Zellfärbung zum Nachweis der IL-10 Produktion (siehe Kapitel 3.6) von PMN-MDSC verwendet.

3.6 Messung der IL-10 Produktion von PMN-MDSC

Für den Nachweis, ob PMN-MDSC in vitro eigenständig IL-10 produzieren, wurde eine extra- und intrazelluläre Zellfärbung vorgenommen. Zuvor isolierte PBMC der *effectors* (siehe Kapitel 3.4) wurden in einer Anzahl von $1,0 \times 10^6$ Zellen in FACS Röhrchen überführt und mit 2 ml PBS + 1% FCS für 10 Min. bei 4°C und 1500 rpm gewaschen. Nach Resuspension des Pellets mit 50 µl PBS wurden die Zellen mit je 10 µl CD14 (FITC), 5 µl CD33 (PE) und 5 µl HLA-DR (PerCP) Antikörpern gefärbt und für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nachdem die überschüssigen Antikörper erneut mit 2 ml PBS ausgewaschen worden sind, wurden die Zellen mit 100 µl Fix & Perm Solution A permeabilisiert und für 15 Min. in Dunkelheit inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang mit 2 ml kaltem PBS und Abzentrifugation wurden die Zellen zur intrazellulären Färbung mit 100 µl Fix & Perm Solution B resuspendiert und erneut für 15 Min. in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl des intrazellulären Antikörpers für IL-10 (APC) hinzugefügt und für weitere 30 Min. bei 4°C inkubiert. Die Färbung wurde mit zwei weiteren Waschgängen in PBS und der Resuspension in 200 µl PBS beendet. Im nächsten Schritt wurden die Zellen am Durchflusszytometer FACSCalibur gezählt und analysiert. Gleichzeitig wurde dieses Versuchsprotokoll parallel mit 1,5 µl einer IL-10 Isotype Controle (APC) durchgeführt, um später für die Auswertung einen Cut-off zur IL-10 Positivität der PMN-MDSC bestimmen zu können. Diese Messung wurde freundlicherweise durch den Kollegen Lukas Arenz durchgeführt.

3.7 Auftauen von PBMC

Für die durchgeführte Versuchsreihe wurden neben den frischen auch sogenannte *target cells* (PBMC) benötigt, anhand derer die Wirkung der separierten PMN-MDSC untersucht werden sollte (siehe Kapitel 3.1). Dazu wurden bereits kryokonservierte PBMC verwendet, die am Untersuchungstag oder längstens am Abend zuvor aufgetaut wurden. Die im Stickstofftank bei -80°C gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 25°C angetaut, sodass sie sich aus dem Einfrierröhrchen lösten und daraufhin direkt in 10 ml gekühltes R10 Medium überführt werden konnten. Im Anschluss fanden insgesamt zwei Waschvorgänge mit 2 ml R10 für 10 Min. bei 4°C und 1500 rpm mit der Zentrifuge statt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand im Röhrchen abgenommen und verworfen und das Pellet in R10 Medium resuspendiert. Daraufhin

wurden 50 µl der Zellsuspension zur automatischen Messung der Zelldichte entnommen und die Gesamtzellzahl berechnet.

3.8 CFSE Färbung der *target cells*

Die Zellfärbung mit CFSE (*Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester*) wurde verwendet, um die Proliferation der zuvor aufgetauten PBMC sichtbar zu machen. CFSE ist ein fluoreszierender, für Zellen relativ unschädlicher Vitalfarbstoff, der durch seine Permeabilität durch Zellmembranen über dessen Succinimidyl-Gruppe kovalent an intrazelluläre Moleküle binden kann und somit dort extrem lange verbleibt ohne wieder sezerniert zu werden. CFSE verteilt sich frei im Zytoplasma und wird bei Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt. Bei erneuter Zellteilung viertelt sich also die Konzentration pro Zelle usw. [104]. Diese Methode eignet sich somit gut für die *in vitro* Darstellung der Zytokinese vitaler Zellen.

Das CFSE wurde in 5 mM bei -80°C gelagert. Für die Färbung wurden je 2 µl CFSE pro maximal 10 Mio. Zellen in 1 ml R10 Medium verwendet und 8 Min. bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Daraufhin erfolgten drei Waschgänge mit R10 bei RT für 10 Min. und 1500 rpm. Nach dem letzten Waschgang wurde das Pellet mit R10 resuspendiert und eine automatische Zelldichtemessung mit CASY® vorgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit R10 Medium auf eine Konzentration von $2,0 \times 10^6$ Zellen pro ml verdünnt und im Brutschrank bei 37°C zwischengelagert.

3.9 Separation von PMN-MDSC aus PBMC-Isolat

In diesem Schritt fand die Isolation von PMN-MDSC aus den zuvor frisch isolierten PBMC der Patienten mit Progressorstatus statt. Zunächst wurde erneut ein Waschvorgang mit 30 ml *PBS+* Lösung durchgeführt. Das PBS ist eine verschiedene Salze enthaltende Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4, die den osmotischen Druck des menschlichen Organismus (Isotonie) besitzt und ein Arbeiten bei physiologischem pH-Wert ermöglicht. Sie dient zur Verdünnung und Reinigung von Zellkulturen und verlängert die Lebensdauer von Proteinen oder Enzymen. EDTA ist ein Komplexbildner, welcher unter anderem Schwermetallionen binden kann. Auf diese Weise wird verhindert, dass Letztere die ebenfalls in einer Lösung vorhandenen Enzyme in ihrer Aktivität hemmen können. FCS hingegen wird zur Kultivierung von Zellen als wichtiger Bestandteil

von Nährmedien benötigt. Dieser Waschvorgang mit der eben beschriebenen Lösung wurde für 10 Min. und bei 870 rpm unter Abschaltung der Bremse durchgeführt. Auf diese Weise sammelten sich die Thrombozyten im Überstand und konnten abpipettiert und verworfen werden. Das Zellpellet wurde in ein steriles FACS Röhrchen überführt und mit 100 μ l *PBS+* pro 10×10^6 Zellen aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10 μ l CD66⁺ Antikörper pro 10×10^6 Zellen für 15 Min. inkubiert. Danach folgten 10 Min. Inkubation mit je 5 μ l magnetischer beads pro 10×10^6 Zellen. Im Anschluss fand ein 7 Durchgänge umfassender Waschvorgang statt, bei dem die mit 2 ml *PBS+* verdünnten Zellen für je 7 Min. in einen Immunmagneten (STEMCELL Technologies Germany GmbH) gestellt wurden. Nach jedem Durchgang wurde der Überstand (im Folgenden als *PBMC-PMN-MDSC* bezeichnet) abgegossen und gesammelt, während die an beads gebundenen Zellen am Rand des Röhrchens stets wieder mit 2 ml *PBS+* resuspendiert wurden. Zum Schluss wurden die separierten PMN-MDSC in 1 ml *PBS+* gelöst und, ebenso wie bei dem gesammelten Rest, eine automatische Zelldichtemessung vorgenommen.

Zur Überprüfung der Reinheit der Separation (siehe Kapitel 3.10) wurden jeweils $0,5 - 1,0 \times 10^6$ der PMN-MDSC und PBMC-PMN-MDSC entnommen und bei 37°C bis zur Weiterverarbeitung inkubiert.

3.10 Überprüfung der Separation mittels Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle der PMN-MDSC Separation wurden die Zellen mit folgender Antikörper-Kombination für den Nachweis von PMN-MDSC gefärbt: 20 μ l CD11b (FITC), 5 μ l CD14 (APC), 5 μ l CD15 (PerCP) und 5 μ l CD66b (PE) (Angaben für $1,0 \times 10^6$ Zellen).

Nach 30 Min. Inkubation bei 4°C und dem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen mit 100 μ l Fix & Perm Solution A für 15 Min. bei RT fixiert. Zum Schluss wurden die Zellen nach erneutem Waschgang mit 2 ml PBS in 200 μ l PBS resuspendiert.

3.11 Ko-Inkubation von PMN-MDSC mit allogenen PBMC \pm IL-10-R α -AB

Für die Ko-Inkubation der CFSE gefärbten *target* Zellen mit den PMN-MDSC der chronisch HIV-Infizierten (*effector cells*) wurden zunächst je $1,0 \times 10^6$ *target* Zellen (in 500 μ l Medium) auf einer 24-Well-Platte vorgelegt. Neben Negativ- (keine Zugabe

einer Stimulanz) und Positiv-Kontrollen (Zugabe von PHA bzw. GagNef-Peptiden) wurden zu den *target* Zellen nun jeweils $0,5 \times 10^6$ PMN-MDSC (=effector Zellen) hinzugegeben. Die Stimulation zur Proliferation wurde entweder unspezifisch mit je 5 μl PHA oder spezifisch mit je 60 μl eines Gag- und eines Nef-Peptidpools vorgenommen. Alle Ko-Inkubationen bis auf die Negativ-Kontrolle wurden doppelt angelegt, sodass insgesamt 7 Wells der Platte befüllt wurden (siehe Abbildung 3.3): In jeweils eines der doppelt vorkommenden Wells wurden nun 10 μl eines IL-10-R α -ABs hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für entweder 3 (bei PHA-Stimulation) oder 5 (bei GagNef-Stimulation) Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

10 - 12 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden pro Well je 1 μl Monensin hinzugefügt und mit 500 μl R10 Medium resuspendiert. Monensin wird dazu verwendet intrazelluläre Transportprozesse während der Zellaktivierung zu blockieren. Dies führt zur Akkumulation von Zytokinen im Golgi-Apparat bzw. dem Endoplasmatischen Retikulum, sodass nachfolgend deren Gehalt gemessen werden kann [105].

Im Anschluss an die 3- bzw. 5-tägige Ko-Inkubation wurden zunächst 800 μl des zellfreien Überstands eines jeden Wells abgenommen und für weitere Untersuchungen mittels ELISA (siehe Kapitel 3.14) bei -80°C eingefroren. Nun wurden die sich am Boden der Wells sammelnden Zellen resuspendiert, per CASY[®] gezählt und $1,0 \times 10^6$ Zellen in FACS Röhrchen überführt, sodass als nächstes die Vorbereitung für die Durchflusszytometriemessung begonnen werden konnte.

Je 1×10^6 Zellen CFSE-gefärbte Controller-PBMC werden pro Well vorgelegt Verhältnis: 2:1			
Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrollen	gMDSC	PBMC-gMDSC
+ $0,5 \times 10^6$ ungefärbte CO-PBMC	+ $0,5 \times 10^6$ ungefärbte CO-PBMC + 5 μl PHA/ 60 μl GagNef	+ $0,5 \times 10^6$ PMN-MDSC + 5 μl PHA/ 60 μl GagNef	+ $0,5 \times 10^6$ PBMC- PMN-MDSC + 5 μl PHA/ 60 μl GagNef
	s.o. + 10 μl IL-10-R α -AB	s.o. + 10 μl IL-10-R α -AB	s.o. + 10 μl IL-10-R α -AB

Abbildung 3.3: Anordnung der Zellkulturen auf der 24-Well-Platte. Insgesamt wurden 7 Wells kultiviert, aufgeteilt in 1 Negativkontrolle, 2 Positivkontrollen, 2 mit PMN-MDSC als effector cells und 2 mit den restlichen PBMC-PMN-MDSC zur Überprüfung der Separation.

3.12 Durchflusszytometrie

Eine Sonderform der Durchflusszytometrie beschreibt die FACS-Analyse (engl. *Fluorescence-activated cell sorting*), bei der die Zellen intra- und/oder extrazellulär mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt werden. Diese Fluoreszenz wird mithilfe eines Lasers gemessen, sodass eine genauere Phänotypisierung der gesuchten Zellpopulation vorgenommen werden kann.

Die Zellen der Ko-Inkubation wurden nun mit 2 ml *PBS+* bei 4°C für 10 Min. gewaschen und hiernach zur extrazellulären Färbung mit je 1 µl CD8 Antikörper für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an einen erneuten Waschgang wurden die Zellen mit 100 µl Fix & Perm Solution A resuspendiert und für 15 Min. inkubiert. Direkt darauffolgend wurde nach erneutem Waschvorgang mit der Fix & Perm Solution B für 15 Min. inkubiert. Diese Lösungen ermöglichen die Fixierung (Medium A) und Permeabilisierung (Medium B) von Zellen, sodass intrazelluläre Moleküle identifiziert werden können und gleichzeitig morphologische Charakteristika intakt bleiben. Im Anschluss wurden die Zellen mit je 5 µl IFN γ AK für 30 Min. intrazellulär gefärbt. Zuletzt folgten zwei weitere Waschgänge mit PBS und letztlich die Resuspension in 200 µl PBS zur Vorbereitung der direkt nachfolgenden FACS-Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur.

3.13 FACS-Analyse und Auswertungen

Die Analyse erfolgte mit dem Programm CellQuestTMPro. Insgesamt wurden für die Messung jeder Probe 100.000 Zellen im Durchflusszytometer gezählt. Die graphische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm FlowJo Software Version 7.2.1 vorgenommen. Zunächst wurden dort die verschiedenen Zellpopulationen anhand des Seitwärtsstreulichts (y-Achse) in Abhängigkeit vom Vorwärtsstreulicht (x-Achse) dargestellt. Der Wert des Vorwärtsstreulichts (engl. *Forward Scatter*, FSC) gibt hierbei das Volumen der Zelle an, während das Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter*, SSC) das Maß für die Granularität im Zellplasma bildet.

In dieser Einstellung wurde zur Detektion der spontanen IL-10 Produktion von PMN-MDSC mit den Markern CD33 und HLA-DR die bekannte PMN-MDSC Population (da CD33^{int}HLA-DR^{-/low}) gated (siehe Abb. 3.4).

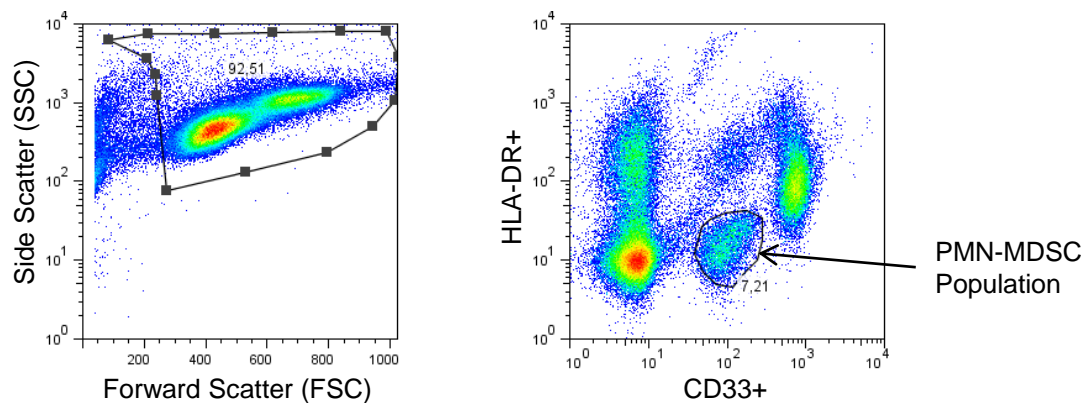


Abbildung 3.4: Gating der PMN-MDSC Population zur IL-10 Messung. Die PMN-MDSC Population ist unter anderem als $CD33^{int}HLA-DR^{-/low}$ definiert.

Zur Bestimmung der spontanen IL-10 Produktion der PMN-MDSC wurde mithilfe einer parallelen APC Isotyp-Kontroll-Messung der individuelle Cut-off für die IL-10 Positivität dieser Zellgruppe festgestellt. Der ermittelte Wert bei Nulldurchgang mit der X-Achse wurde exakt auf die IL-10 Messung der *effector* PMN-MDSC übertragen. Somit konnten die prozentualen IL-10⁺ und IL-10⁻ Anteile der PMN-MDSC abgelesen werden.

In den Abbildungen 3.5 und 3.6 ist dieses Vorgehen dargestellt.

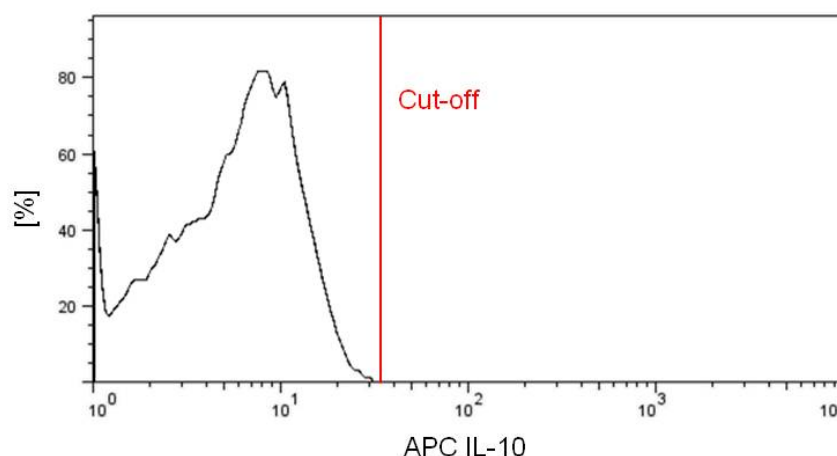


Abbildung 3.5: Festlegung des Cut-offs zur IL-10 Positivität mithilfe einer Isotype Control.

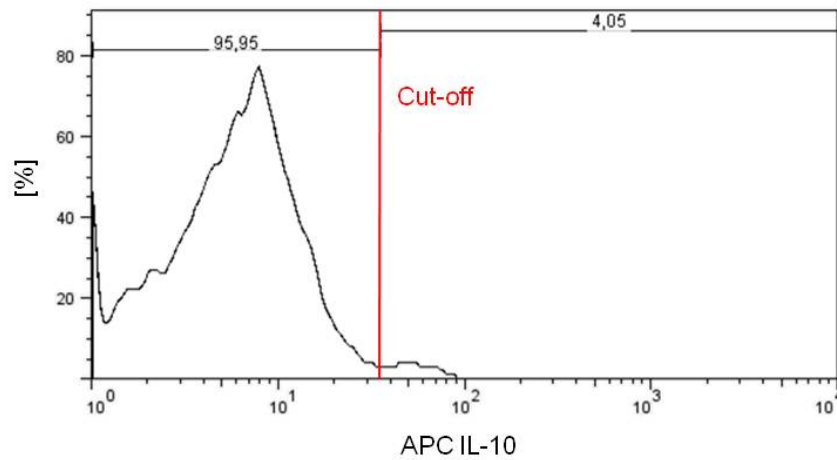


Abbildung 3.6: Bestimmung des IL-10⁺ und IL-10⁻ PMN-MDSC Anteils. Dabei wurde der Cut-off der APC Isotype Control auf diese Messung übertragen.

Zur Überprüfung des Erfolgs der PMN-MDSC Separation wurde zunächst die gesamte Monozytenpopulation eingeschlossen, sodass bei den weiteren Gatings ausschließlich diese Zellen analysiert wurden (siehe Abbildung 3.7, a). Anschließend wurde die PMN-MDSC Population nach den spezifischen Markern CD15⁺CD66⁺CD11b⁺CD14⁻ detektiert (siehe Abb. 3.7, b) und c). Durch Berechnung der Anteile an den Gesamt-PBMC konnte nun auf die Reinheit der Separation und die Höhe der isolierten PMN-MDSC geschlossen werden.

In Abbildung 3.7 ist dieser Vorgang der Auswertung veranschaulicht.

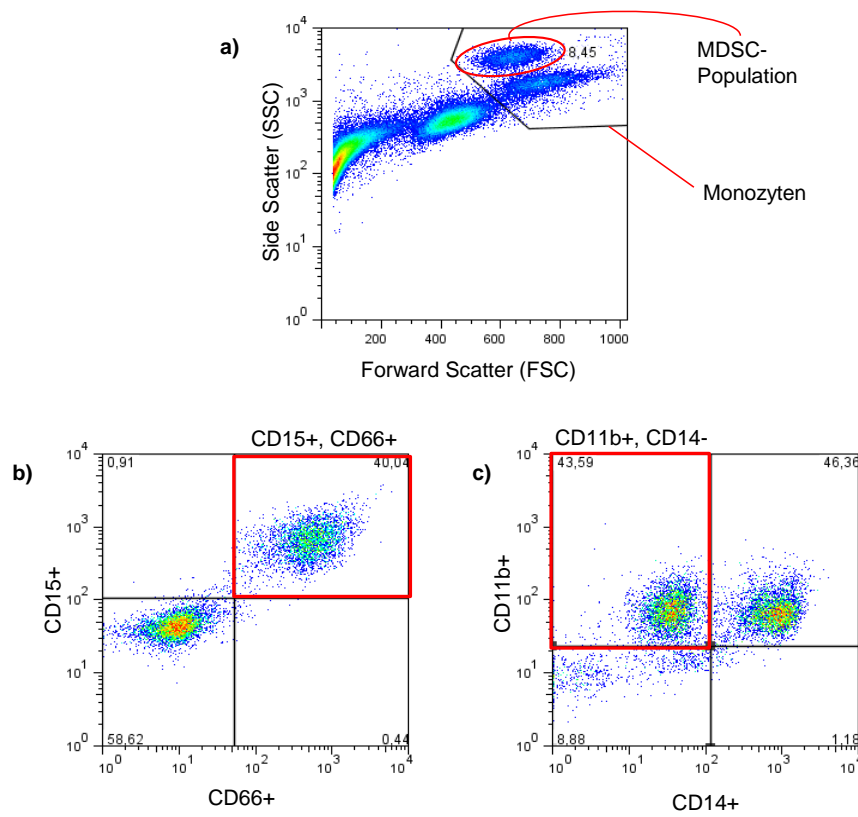


Abbildung 3.7: Gating der MDSC-Population innerhalb der effector PBMC. Es wurde auf die Monozyten gated und im Folgenden die Aufschlüsselung nach den PMN-MDSC Markern $CD15^+ CD66^+ CD11b^+ CD14^-$ vorgenommen.

Für die Auswertung der Ko-Inkubationen wurde nach ähnlichem Schema vorgegangen. Zunächst wurden die allgemein proliferierenden Zellen definiert. Proliferation wurde durch CFSE sichtbar gemacht und durch entsprechende Antikörper-Markierung speziell die $CD8^+$ Fraktion betrachtet. Im Anschluss wurde von diesen Zellen die $IFN\gamma$ Produktion bestimmt.

Beispielhaft wird dieses Vorgehen anhand einer ausgewählten Positiv-Kontrolle illustriert (siehe Abb. 3.8).

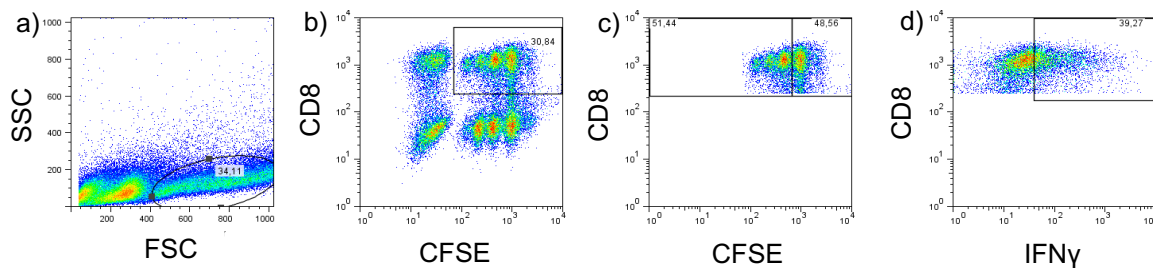


Abbildung 3.8: Gating der CD8⁺ Population in den PBMC der targets. Es wurde zunächst auf die proliferierten Lymphozyten gated und im Folgenden die Gruppe der CD8⁺ Zellen auf ihre Proliferation und IFN γ Produktion untersucht.

3.14 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für IL-10

Hierfür wurde das speziell für den IL-10 Nachweis generierte ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-10 verwendet.

Für diesen Test wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Zuerst wurde diese Platte mit dem in einem *Coating Buffer* gelösten *Capture Antibody* beschichtet und 16 - 18 Stunden bei 4°C über Nacht inkubiert (1.). Nach Ablauf dieser Zeit wurden alle Proben auf Raumtemperatur gebracht und nach viermaligem Waschgang mit je 300 μ l *Wash Buffer* pro Well zunächst je 200 μ l *Assay Diluent A* hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler mit 200 rpm inkubiert, um unspezifische Bindungen zu hemmen. Für den weiteren Verlauf war es wichtig, dass nach jedem Schritt ein standardisierter viermaliger Waschvorgang durchlaufen wurde, bevor ein neues Reagenz hinzugefügt wurde. Dies wird im Folgenden nicht mehr explizit erwähnt. Während der Inkubationszeit wurde nun eine Verdünnungsreihe aus der IL-10 *Stock Solution* mit den jeweiligen Standardkonzentrationen 250 / 125 / 62,5 / 31,3 / 15,6 / 7,8 und 3,9 pg/ml hergestellt. Als 0 pg/ml des Standards diente ausschließlich das Assay Diluent A. Anschließend wurden die angefertigten Standards und die eigenen Proben in die dafür vorgesehenen Wells transferiert und für zwei Stunden erneut unter Schütteln inkubiert (2.). Als nächstes Reagenz wurden je 100 μ l eines biotinylierten *Detection Antibody* pro Well hinzugefügt und für eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert (3.). Dieser hatte die Aufgabe sich an das am immobilen IL-10-Antikörper gebundene IL-10 anzuheften und somit ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich zu bilden. Als nächster Schritt folgte die Zugabe von Avidin-HRP (=Horseradish Peroxidase), welches sich an den biotinylierten Detektions-Antikörper heftete (4.). Daraufhin schloss sich die Addition von

frisch hergestellter 1:1 Mischung aus TMB (Tetramethylbenzidin) Substratlösung A und B an, welche eine Blaufärbung der Flüssigkeiten je nach IL-10 Konzentration innerhalb der Wells verursachte (5.). Zuletzt führte die Zugabe der *Stop Solution* zur Farbumkehr von blau nach gelb (6.). Damit war der Versuchsvorgang abgeschlossen und es wurde die jeweilige Absorption in jedem Well bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Min. mithilfe eines Microplate Readers (GENios Pro, Tecan®) gemessen.

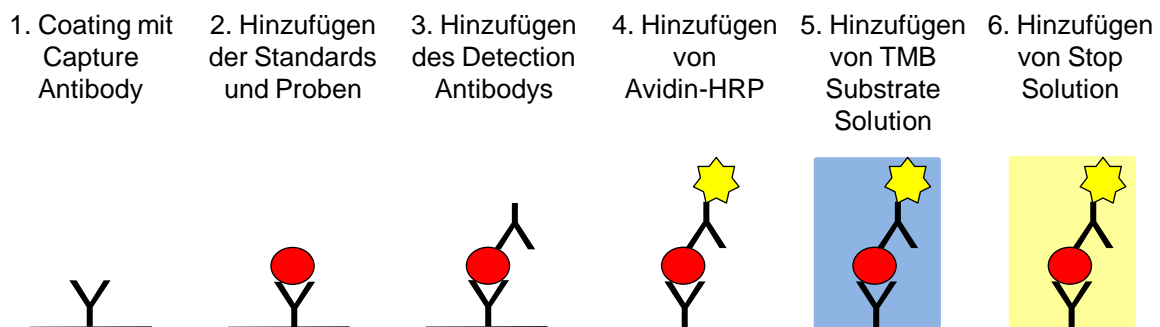


Abbildung 3.9: **Zusammenfassung des Ablaufs des humanen IL-10 ELISA Tests** (angelehnt an [106]).

3.15 Statistische Auswertung

Für Berechnungen und Bearbeitungen der Daten der ELISA Tests wurde die Microsoft Office Excel Software 2010 verwendet. Die anschließende statistische Auswertung und graphische Darstellung aller erhobener Ergebnisse ist mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.0 durchgeführt worden. Um Vergleiche zwischen Gruppen mehrerer Ergebnispaaire anstellen zu können, wurde zunächst der *paired t-test* verwendet. Aufgrund der mangelnden Normalverteilung der Daten wurden diese erneut mit dem *Wilcoxon matched pairs Test* berechnet. Da dies keinen Einfluss auf die Endergebnisse hatte, ist in dieser Arbeit noch der *paired t-test* dokumentiert. Zum Vergleich von Daten unterschiedlicher Gruppen wurde der *Mann-Whitney-Test* eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen bei $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte hauptsächlich in Form von Säulendiagrammen mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung und p-Werte oder in Diagrammen mit Einzeldatenpunkten und eingezeichnetem Median.

4 Ergebnisse

4.1 Keine bis sehr geringe spontane IL-10 Produktion durch PMN-MDSC *ex vivo*

Zunächst sollte herausgefunden werden, ob PMN-MDSC im Rahmen der chronischen HIV-1 Infektion selbständig in der Lage sind IL-10 zu produzieren. Dazu wurden insgesamt 10 Vollblutproben von gesunden Probanden (HC) mit denen von 10 chronisch HIV-infizierten Patienten verglichen.

Der Vergleich beider Gruppen ist in Abbildung 4.1 dargestellt, wobei der Unterschied nicht signifikant war.

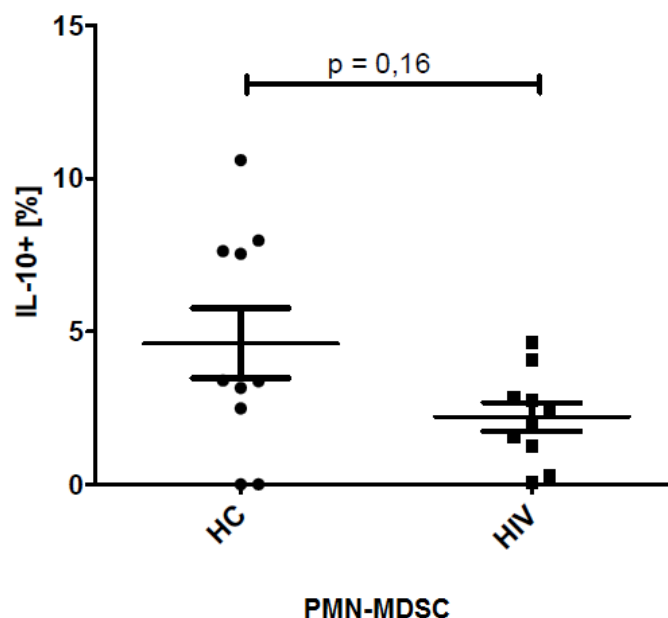


Abbildung 4.1: Gegenüberstellung der spontanen IL-10 Produktion der PMN-MDSC von HCs und HIV-Patienten *ex vivo*. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der IL-10 Produktion beider Gruppen von PMN-MDSC festgestellt werden ($p = 0,16$; Mann-Whitney-Test).

Die Daten zeigen, dass PMN-MDSC sowohl im gesunden Probanden als auch während der chronischen HIV-1 Infektion offensichtlich nur wenig bis gar kein IL-10 spontan produzieren. Der Anteil IL-10 positiver PMN-MDSC bewegt sich innerhalb der gesunden Probanden zwischen 0,0% und etwa 11,0%, während er bei den HIV-Patienten zwischen 0,08% und etwa 4,6% liegt.

Zusammenfassend ergibt sich kein Hinweis darauf, dass IL-10 als Zellmediator von PMN-MDSC der HC oder derer von HIV-Trägern spontan gebildet wird.

4.2 Reproduktion der Proliferationshemmung durch PMN-MDSC

Unsere Forschungsgruppe konnte bereits nachweisen, dass PMN-MDSC in der chronischen HIV-1 Infektion signifikant die Proliferation von CD8 T-Zellen von HIV-Controllern hemmen [29]. Jene Erkenntnis wurde auch dieser Arbeit zugrunde gelegt und zu Beginn der Studie erneut erfolgreich reproduziert ($p_1 = 0,02$ (PHA) und $p_2 = 0,01$ (GagNef)) (siehe Abbildung 4.2).

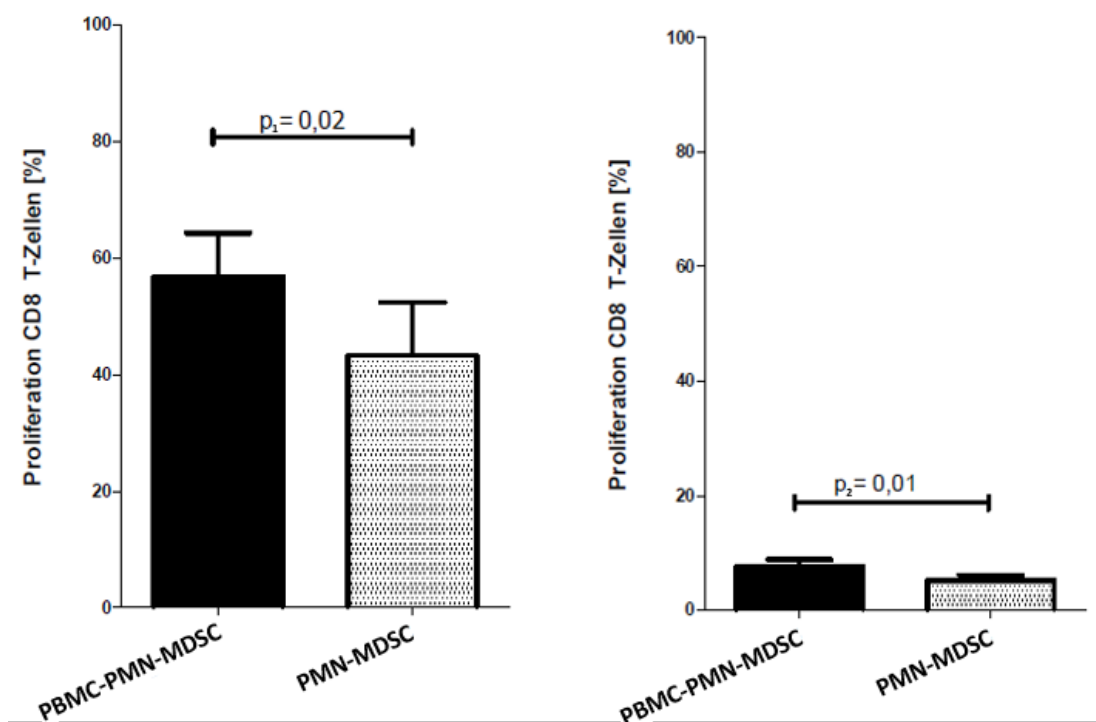


Abbildung 4.2: Hemmung der CD8 T-Zell-Proliferation der targets durch effector PMN-MDSC.

Unter beiden Stimulationsformen (PHA / GagNef) wurde die signifikante Hemmung der Zellproliferation durch PMN-MDSC reproduziert ($p_1 = 0,02$ und $p_2 = 0,01$; Paired t-Test).

4.2.1 Unterschiede der Proliferation zwischen PHA und GagNef

Ebenfalls sehr eindrücklich wurde der immense Unterschied der quantitativen Proliferation zwischen spezifischer und unspezifischer Stimulation deutlich. Dies obliegt der Tatsache, dass durch spezifische Stimulation mittels eines HIV-Peptid-Pools weitaus weniger (HIV-sensitive) Zellen aktiviert werden als bei einer unspezifisch wirksamen Substanz.

Abbildung 4.3 stellt die Unterschiede innerhalb der Zellproliferation zwischen PHA- und GagNef-Stimulation dar. Betrachtet wird dabei sowohl die Proliferation der PMN-MDSC-depletierten Zellkultur (*PBMC-PMN-MDSC*) als auch der PMN-MDSC-Kultur (*PMN-MDSC*). Des Weiteren wird das jeweilige Proliferationsausmaß der einzelnen Zellpopulationen bei unterschiedlicher Stimulierung miteinander verglichen.

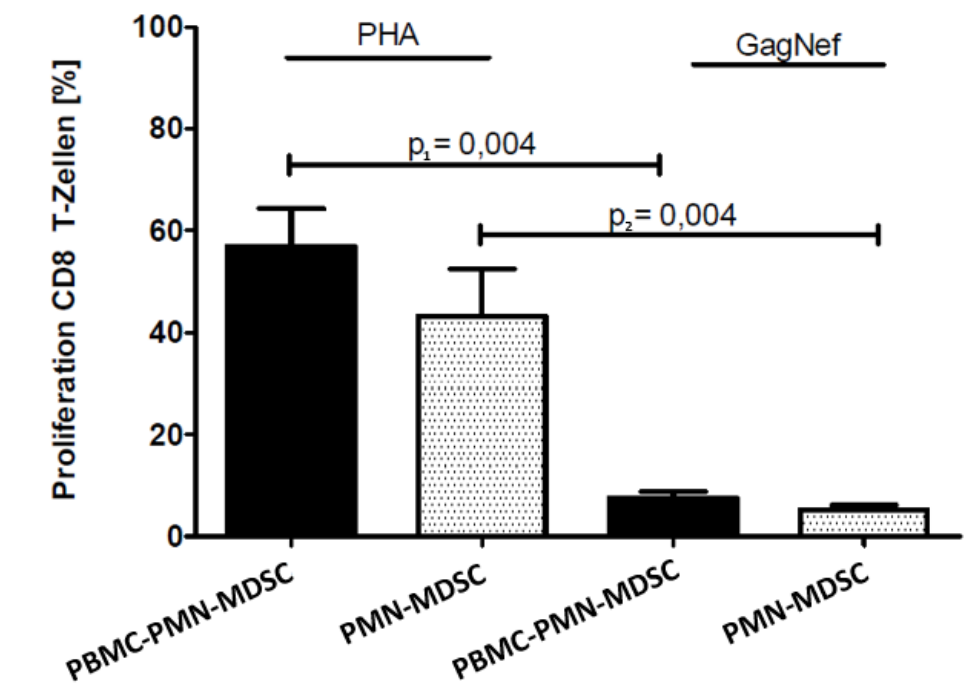


Abbildung 4.3: Vergleich der quantitativen Proliferation der CD8 T-Zellen unter Stimulation mit PHA und GagNef-Peptiden. Betrachtet wurden sowohl die Zellkulturen mit Zugabe von PMN-MDSC, als auch die PMN-MDSC-depletierten Kulturen. Die Unterschiede waren in beiden Fällen signifikant ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test).

Wir konnten zeigen, dass sich die Proliferation von PHA und GagNef signifikant unterscheidet ($p < 0,05$). Darüber hinaus ist erkennbar, dass das Wachstum unter PHA im Mittel bei etwa 57,0% lag (jeweils *PBMC-PMN-MDSC* betrachtet). Unter spezifischer Stimulation mit GagNef-Peptiden proliferierten hingegen nur rund 7,5% der CD8 T-Zellen.

Aufgrund dieser Tatsache wird ersichtlich, dass es weitaus schwieriger ist unter GagNef-Stimulation qualitativ hochwertige und verwendbare Ergebnisse zu produzieren, da die Zellkulturen allgemein empfindlicher reagieren und Unterschiede teilweise nicht so eindeutig zum Ausdruck kommen. Dieser Aspekt ist vor allem bedeutsam bei der Frage nach messbaren Veränderungen in der Zellproliferation, wie es in Kapitel 4.3 noch besprochen wird. Weiterhin muss dieser Sachverhalt für mögliche Ansätze einer Interpretation berücksichtigt werden.

4.2.2 Allgemeiner Einfluss durch Einsatz des IL-10-R α -ABs

Im Laufe der Studie fiel auf, dass allein durch die Zugabe des IL-10-R α -ABs in eine identische Zellkultur das Zellwachstum beeinflusst wurde. So war stets nach Zugabe des Antikörpers eine etwas geringere Proliferation innerhalb der Zellkultur messbar, und zwar unabhängig von der Addition von proliferationshemmenden *effector* PMN-MDSC. In der Abbildung 4.4 wird diese Beobachtung in Form eines Säulendiagramms demonstriert.

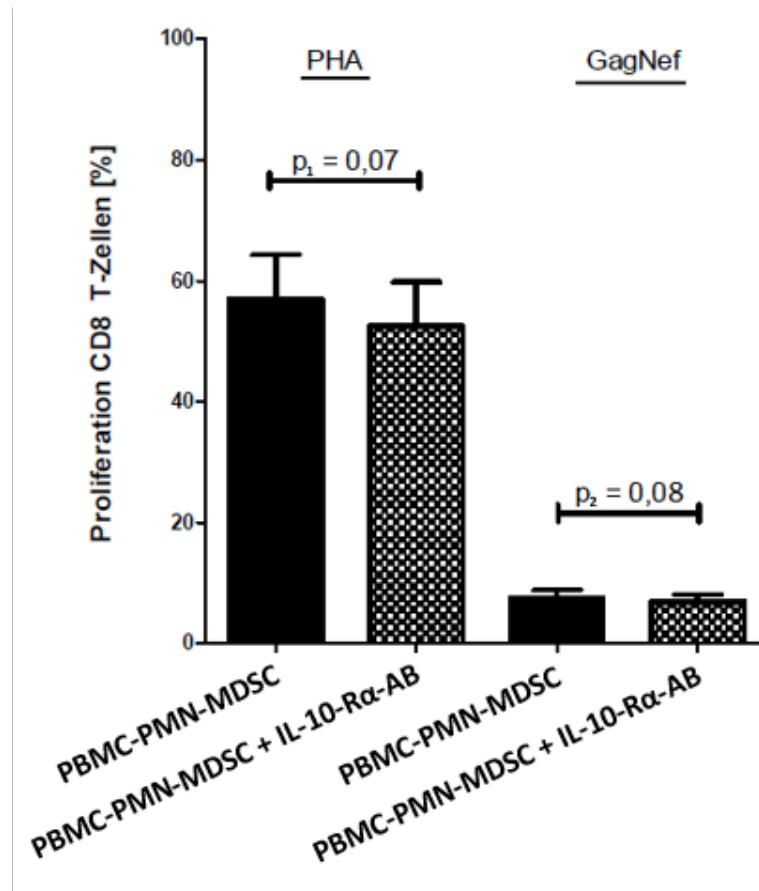


Abbildung 4.4: **Vergleich der Proliferation mit und ohne Zugabe des IL-10-R α -ABs unter PHA- und GagNef-Stimulation.** Hierfür wurden nur die Zellkulturen mit PBMC-PMN-MDSC betrachtet, also in Abwesenheit von PMN-MDSC. Wenngleich ein Unterschied im Umfang der Proliferation sichtbar ist, ist er jedoch weder unter PHA ($p_1 = 0,07$; Paired t-Test) noch unter GagNef ($p_2 = 0,08$; Paired t-Test) signifikant.

Abbildung 4.5 zeigt eine ähnliche Gegenüberstellung für die IFN γ Produktion.

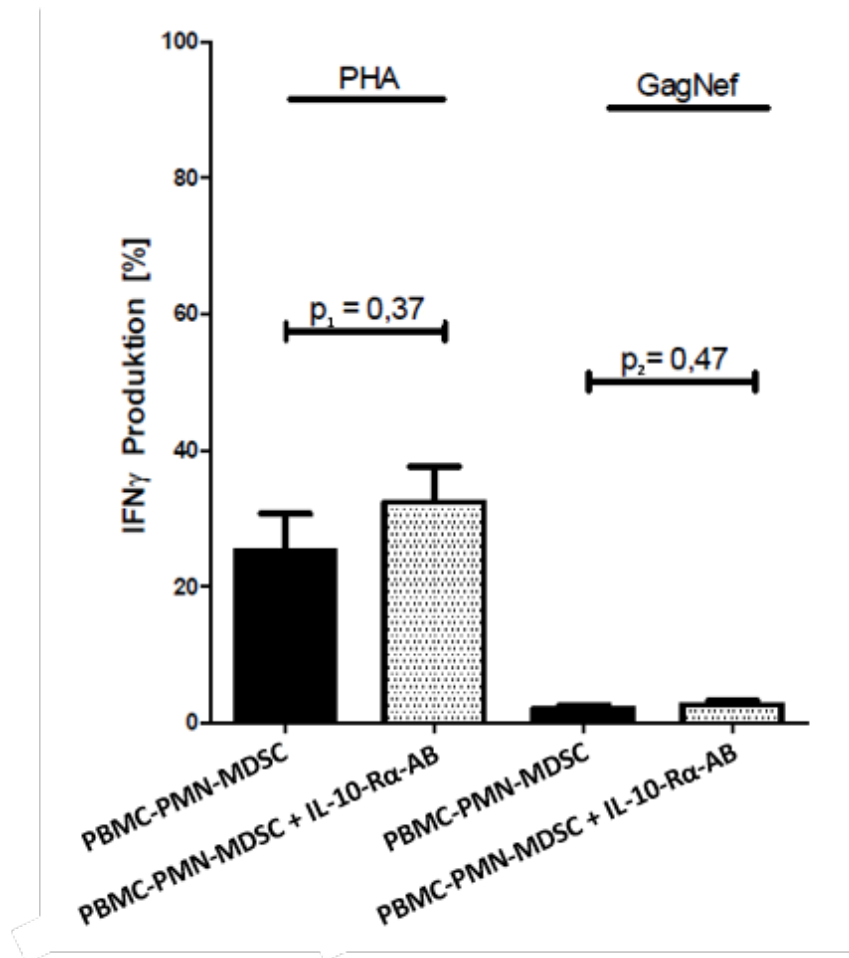


Abbildung 4.5: Vergleich der IFN_{γ} Produktion von PBMC-PMN-MDSC mit und ohne IL-10-R α -AB (PHA und GagNef). Der Einsatz des IL-10-R α -ABs beeinträchtigte die IFN_{γ} Messungen sowohl bei PHA ($p_1 = 0,37$; Paired t-Test) als auch bei GagNef ($p_2 = 0,47$; Paired t-Test) nicht signifikant.

Letztendlich konnte in der Gesamtschau aller Proliferationsassays keine signifikante Modifikation allein durch den Einsatz des IL-10-R α -ABs festgestellt werden. Für die IFN_{γ} Produktion mit und ohne IL-10-R α -AB gab es keine tendenziellen Unterschiede wie bei der Proliferation.

4.3 Proliferationshemmung nach IL-10-R α Blockade teils reversibel

Die Proliferations-Assays lassen sich insgesamt in zwei Gruppen unterteilen: In der ersten Gruppe wurde die Zellkultur unspezifisch mit PHA zur Proliferation stimuliert. Der

zweiten Gruppe wurde stattdessen der spezifische GagNef-Peptidpool hinzugefügt. Mit Blick auf die Endergebnisse fielen Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf, sodass diese getrennt voneinander besprochen werden.

Zur Veranschaulichung der Proliferationsassays ist in Abbildung 4.6 zunächst eine ausgewählte Ko-Inkubation im Überblick dargestellt.

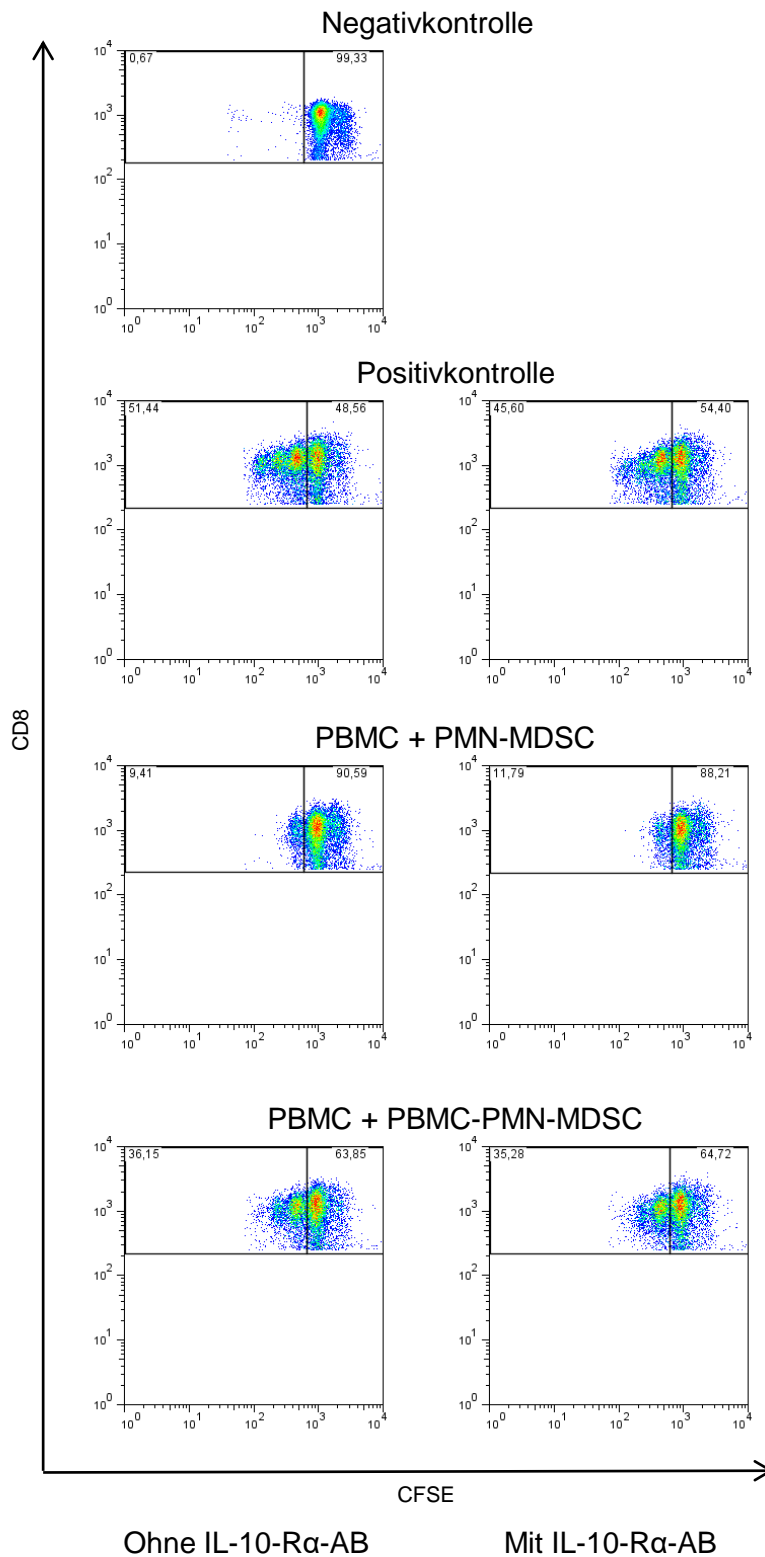


Abbildung 4.6: **Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie eines exemplarischen Assays zur CD8 Zell-Proliferation.** Anhand der Dotplots wird die variierende CD8 Proliferation visualisiert.

PHA-stimulierte Assays:

Es zeigte sich, dass unter Zugabe eines IL-10-R α -ABs die Proliferationsfähigkeit der CD8 T-Zellen trotz permanenter Anwesenheit von HIV-PMN-MDSC in beiden Zellkulturen zwar nicht vollständig, aber dennoch signifikant ($p = 0,03$) wiederhergestellt wurde.

Diese Resultate sind in Abbildung 4.7 aufgezeichnet.

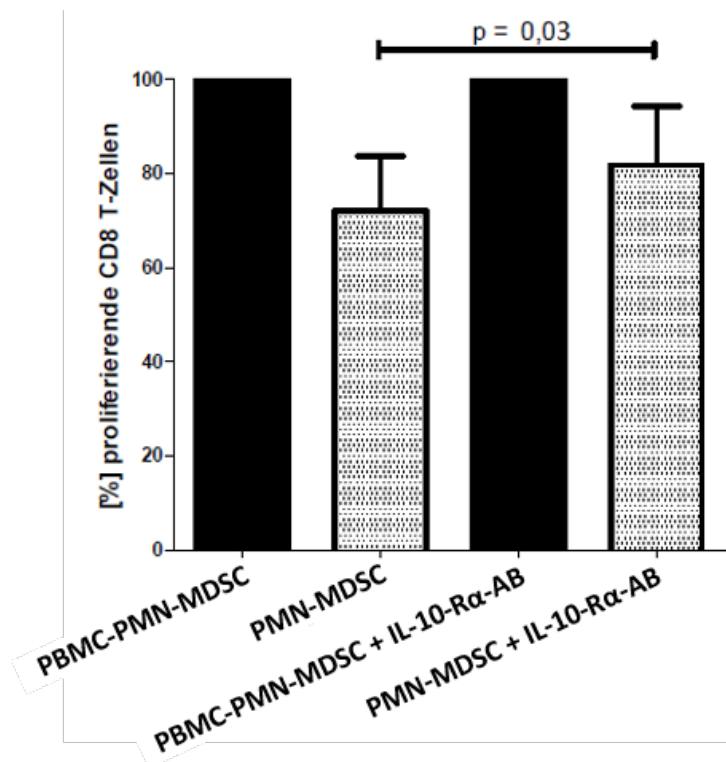


Abbildung 4.7: Ko-Inkubation von CD8 T-Zellen (target cells) mit und ohne Zugabe von PMN-MDSC (effector cells) und unter Einsatz von IL-10-R α -AB (PHA-stimuliert). Die Zugabe des IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers führte zur signifikanten, partiellen Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit der CD8 T-Zellen der targets ($p = 0,03$; Paired t-Test), welche zuvor unter alleiniger Kultivierung mit effector PMN-MDSC gehemmt wurde. Die Proliferation wurde quantifiziert als Prozentsatz der proliferierenden Zellen mit PMN-MDSC von denen im PBMC-PMN-MDSC Assay und letztlich mit den Ergebnissen der Assays unter Zugabe des IL-10-R α -AB verglichen.

GagNef-stimulierte Assays:

Betrachtet man auf dieselbe Weise die Ergebnisse zur Proliferation der CD8 T-Zellen unter spezifischer Stimulation mit GagNef mit und ohne Zugabe des IL-10-R α -ABs, lassen sich ähnliche Tendenzen wie unter PHA-Stimulation erkennen. In diesem Fall gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,28$).

Die genauen Ergebnisse werden in Abbildung 4.8 gegenübergestellt.

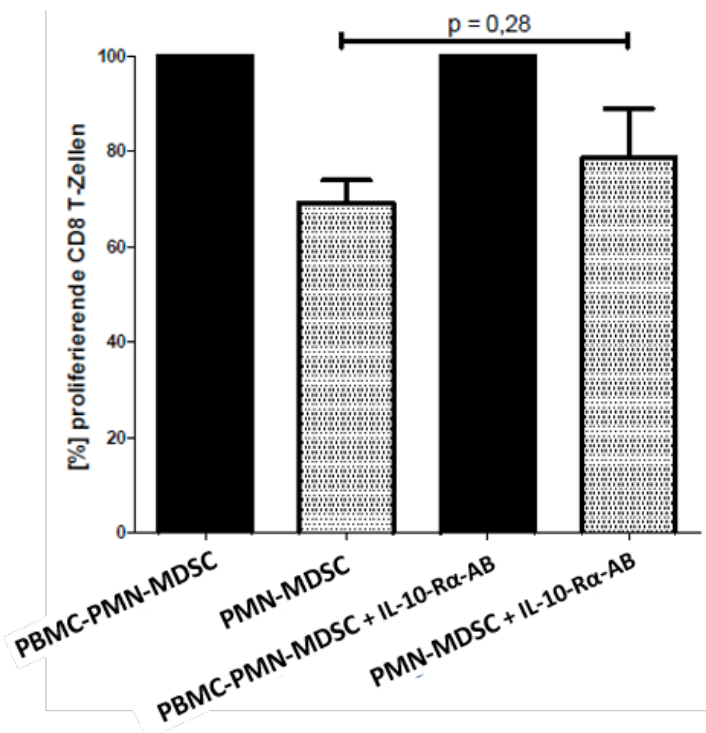


Abbildung 4.8: Ko-Inkubation von CD8 T-Zellen (target cells) mit und ohne Zugabe von PMN-MDSC effector cells und unter Einsatz von IL-10-R α -AB (GagNef-stimuliert). Die Zugabe des IL-10-R α -ABs führte zu keiner signifikanten Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit der CD8 T-Zellen der targets ($p = 0,28$; Paired t-Test), welche zuvor unter alleiniger Kultivierung mit effector PMN-MDSC gehemmt wurde. Auch hier wurde zunächst die prozentuale Proliferation mit PMN-MDSC im Vergleich zu Assays mit PBMC-PMN-MDSC bestimmt und mit den Ergebnissen unter IL-10-R α -AB Zugabe verglichen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass nach Addition des IL-10-R α -ABs die Proliferationsfähigkeit der CD8 T-Zellen wieder hergestellt wird. Dies erreichte in den PHA-stimulierten Assays Signifikanz, in den spezifischen GagNef-Assays nicht.

4.4 Reduktion der IFN γ Produktion nach Zugabe von IL-10-R α -AB

Während es nach Addition des IL-10-R α -ABs zu einer partiellen Wiederherstellung der T-Zellproliferation innerhalb der Zellkulturen kam, beobachteten wir eine reduzierte Produktion von IFN γ nach Zugabe desselben Antikörpers.

Eine Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit Analyse der IFN γ Produktion wird anhand eines ausgewählten Beispiels in der nachfolgenden Abbildung 4.9 gezeigt.

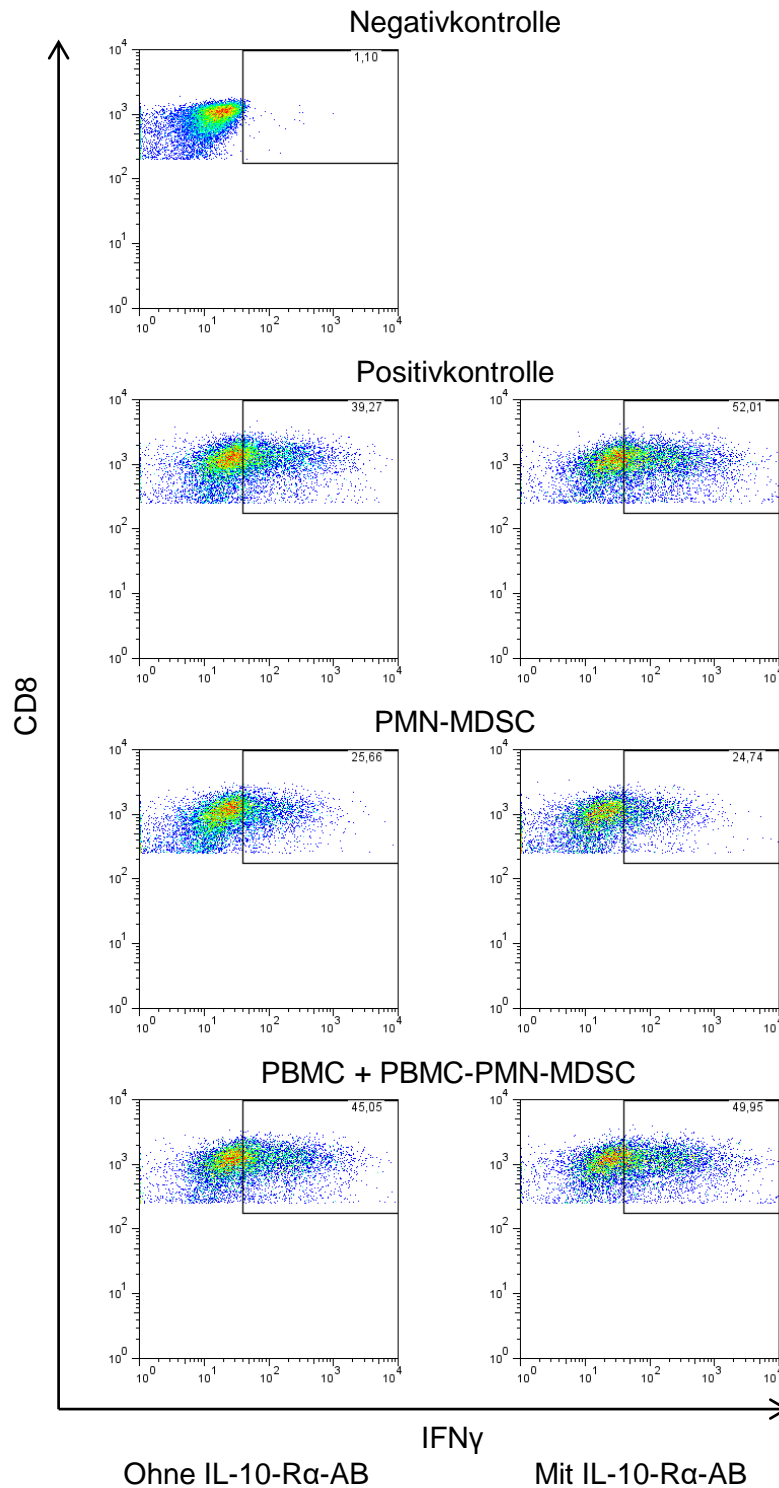


Abbildung 4.9: **Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur IFN γ Produktion.** Die Positivität für IFN γ wurde ausschließlich innerhalb der CD8 $^{+}$ Zellpopulation gemessen. Als Referenz zum korrekten Gating wurde stets dasselbe Gatingfenster der Negativkontrolle verwendet.

Wie auch bei der Proliferation wird bei der Betrachtung der $\text{IFN}\gamma$ Produktion eine Unterteilung nach Stimulationsart vorgenommen.

PHA-Stimulation: Zunächst fällt auf, dass bei der PHA-stimulierten Ko-Inkubation von *target* PBMC mit den *effector* PMN-MDSC im Vergleich zur PMN-MDSC-depletierten Kultur (*PBMC-PMN-MDSC*) die $\text{IFN}\gamma$ Produktion allgemein verringert zu sein scheint, jedoch ohne Annahme von Signifikanz ($p_1 = 0,49$). Dasselbe gilt auch zwischen den PMN-MDSC- und PBMC-PMN-MDSC-Kulturen unter Zugabe des IL-10-R α -ABs ($p_2 = 0,21$).

Insgesamt fällt allerdings die $\text{IFN}\gamma$ Produktion nach Zugabe des IL-10-R α -ABs zu den Ko-Inkubationen geringer aus. Vergleicht man den Einfluss des IL-10-R α -ABs in beiden PMN-MDSC-Kulturen, ergibt sich ein signifikanter Unterschied der $\text{IFN}\gamma$ Produktion nach Antikörper-Zugabe ($p_3 = 0,008$).

In der nachfolgenden Abbildung 4.10 werden die prozentualen Anteile der $\text{IFN}\gamma$ Produktion der CD8 T-Zellen gegenübergestellt und verglichen.

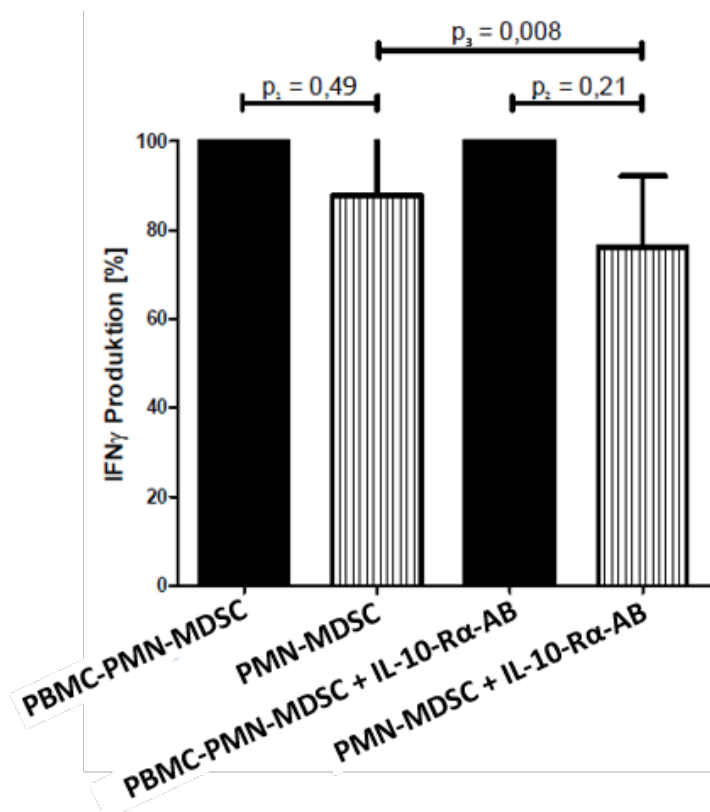


Abbildung 4.10: $\text{IFN}\gamma$ Produktion der CD8^+ Zellen von HIV-Patienten (PHA-stimuliert). Die $\text{IFN}\gamma$ Produktion wurde nur in den PMN-MDSC Assays durch Zugabe des IL-10-R α -AB ($p_3 = 0,008$, Paired t-Test) signifikant reduziert.

GagNef-Stimulation: Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich unter spezifischer Stimulation mit GagNef-Peptiden.

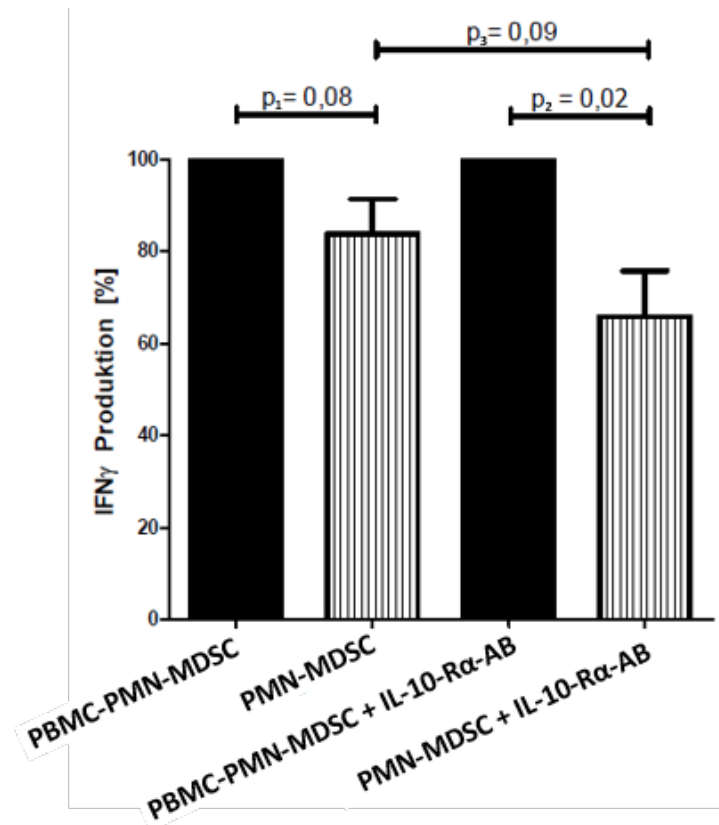


Abbildung 4.11: *IFN γ Produktion der CD8⁺ Zellen von HIV-Patienten (GagNef-stimuliert).* Die Reduktion der IFN γ Produktion durch Zugabe von PMN-MDSC erreichte in den Kulturen mit IL-10-R α -AB Signifikanz ($p_2 = 0,02$; Paired t-Test), nicht aber allein durch Zugabe des IL-10-R α -AB zu den PMN-MDSC Assays ($p_3 = 0,09$; Paired t-Test).

Auch in den mit GagNef stimulierten Ko-Inkubationen zeigt sich analog zu PHA eine geringere IFN γ Produktion in der PMN-MDSC-Kultur im Vergleich zur PMN-MDSC-depletierten Kultur. Dieser Unterschied ist nur in den Assays unter Zugabe des IL-10-R α -AB signifikant ($p_2 = 0,02$).

Insgesamt liegt im Gegensatz zur PHA-Stimulation kein signifikanter Unterschied in der IFN γ Produktion zwischen den PMN-MDSC-Kulturen mit und ohne Zugabe des IL-10-R α -ABs vor ($p_3 = 0,09$).

Zusammengefasst ist keine Wiederherstellung bzw. Steigerung der IFN γ Produktion nach Zugabe des IL-10-R α -ABs festzustellen. In den PHA Assays kommt es zu einer

signifikanten Abnahme der $\text{IFN}\gamma$ Produktion in der Zellkultur $\text{PMN-MDSC} + \text{IL-10-R}\alpha\text{-AB}$. Unter GagNef-Stimulation liegt keine Signifikanz vor.

4.5 Erniedrigter IL-10 Gehalt nach Einsatz von IL-10-R α -AB

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der IL-10-Gehalt des Überstandes der Ko-Inkubationen gemessen.

Die Messergebnisse wurden für PHA und GagNef separat ausgewertet.

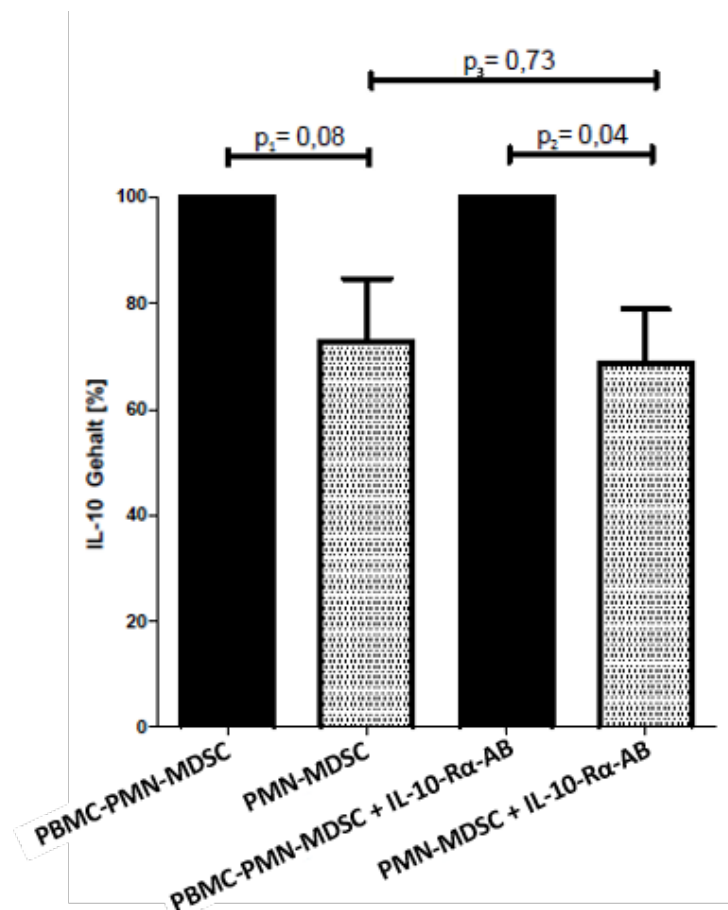


Abbildung 4.12: IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen (PHA-Assays). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den PMN-MDSC-Assays mit und ohne IL-10-R α -AB messbar ($p_3 = 0,73$; Paired t-Test). Die Verringerung des IL-10 Gehalts bei Zugabe von PMN-MDSC nahm nur innerhalb der Antikörper-Assays Signifikanz an ($p_1 = 0,08$ und $p_2 = 0,04$; Paired t-Test).

Die Abbildung 4.12 zeigt die jeweiligen Werte des IL-10 Gehalts mit Bezug auf die beiden Referenzgruppen mit dem PBMC-PMN-MDSC-Anteil.

Unter PHA-Stimulation verringert sich der IL-10 Gehalt bei Kultivierung mit PMN-MDSC. In Anwesenheit des Antikörpers erreicht dies statistische Signifikanz ($p_2 = 0,04$), ohne Antikörper-Zugabe hingegen zeigt sich nur ein Trend ($p_1 = 0,08$). Weiterhin war der IL-10 Gehalt innerhalb der PMN-MDSC-Zellkulturen vergleichbar ($p_3 = 0,73$).

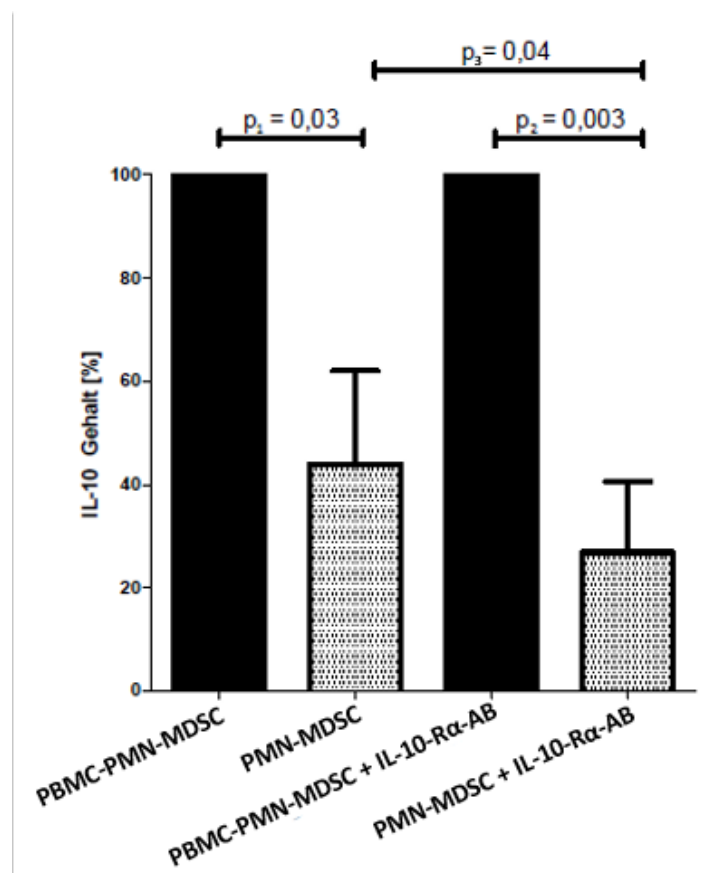


Abbildung 4.13: IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen (GagNef-Assays). In diesem Fall war ein signifikanter Unterschied zwischen den PMN-MDSC-Assays mit und ohne IL-10-Rα-AB zu verzeichnen ($p_3 = 0,04$; Paired t-Test). Ebenso war eine signifikante Reduktion des IL-10 Gehalts bei Ko-Kultivierung mit PMN-MDSC sowohl mit als auch ohne Antikörper messbar ($p_1 = 0,03$ und $p_2 = 0,003$; Paired t-Test).

In den GagNef-stimulierten Assays war sowohl mit als auch ohne das Hinzufügen des IL-10-Rα-ABs der IL-10 Gehalt in den zellfreien Überständen signifikant verringert ($p_1 = 0,03$ ohne und $p_2 = 0,003$ mit IL-10Rα-AB). Auffallend war, dass der IL-10 Gehalt

bei der Inkubation PMN-MDSC+IL-10-R α -AB nochmals signifikant niedriger war im Vergleich zu der Inkubation ohne IL-10-R α -AB ($p_3 = 0,04$).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse der IL-10 Messungen aus den zellfreien Kultur-Überständen, dass die Anwesenheit von PMN-MDSC im Wesentlichen mit einer reduzierten Menge von Interleukin-10 einhergeht. Dabei war die Menge an IL-10 bei PMN-MDSC mit IL-10-R α -AB am niedrigsten.

4.6 Absoluter IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen unterscheidet sich signifikant zwischen unspezifischer und spezifischer Stimulation

Als Letztes wurden die absoluten Werte der IL-10-Messung in den abgenommenen Ko-Inkubations-Überständen ausgewertet und miteinander verglichen.

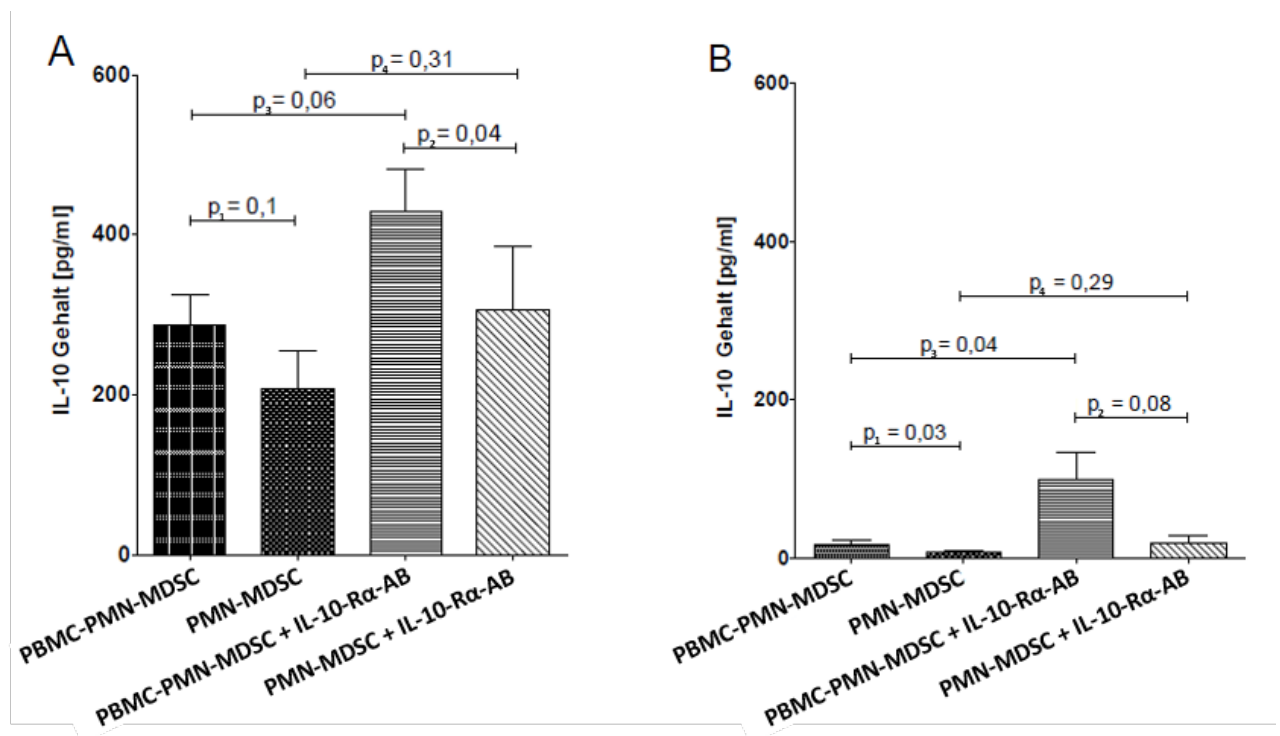


Abbildung 4.14: Übersicht absoluter IL-10 Gehalt in den Zellkultur-Überständen (A: PHA und B: GagNef). Die angezeigten p-Werte wurden mit dem Paired t-Test bestimmt.

Das Diagramm zeigt, dass in den Assays mit PMN-MDSC und PMN-MDSC + IL-10-R α -AB im Vergleich zu dem jeweiligen Assay PBMC-PMN-MDSC mit oder ohne IL-10-R α -AB niedrigere Mengen an IL-10 vorliegen. Dies wird bei PHA (A) in den Assays mit IL-10-R α -AB ($p_2 = 0,04$) und bei GagNef (B) in denen ohne den IL-10-R α -AB ($p_1 = 0,03$) signifikant. Es fällt auf, dass in den Wells mit Anwesenheit des IL-10-R α -ABs in absoluter Zahl mehr IL-10 messbar ist als in jenen ohne den blockierenden Antikörper. Dies wird signifikant bei PBMC-PMN-MDSC mit versus ohne IL-10-R α -AB unter GagNef ($p_3 = 0,04$).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass tendenziell weniger IL-10 in Zellkultur-Überständen mit PMN-MDSC vorliegt und eine generelle Zugabe des IL-10-R α -ABs zu erhöhten Werten von IL-10 im Überstand im Vergleich zu den Überständen ohne Anwesenheit des Antikörpers führt.

5 Diskussion

Die genauen Wirkmechanismen von PMN-MDSC in der chronischen HIV-1 Infektion sind im Vergleich zu ähnlichen Forschungsgebieten im Rahmen von Tumorerkrankungen bisher nur teilweise geklärt. IL-10 wurde als Wirkmechanismus für MDSC postuliert. Deswegen stellten wir die Hypothese auf, dass IL-10 eine Rolle für die Funktion von PMN-MDSC in der chronischen HIV-1 Infektion spielt.

In unseren Untersuchungen konnten wir letztlich keine eigenständige Bildung von IL-10 durch PMN-MDSC nachweisen. Dennoch scheint IL-10 für die allgemeine Wirkung von PMN-MDSC eine Rolle zu spielen, was durch die partielle Wiederherstellung der zuvor durch PMN-MDSC gehemmten CD8 T-Zellproliferation nach Einsatz des IL-10-R α -ABs anzunehmen ist.

5.1 Patientenkohorte und Probenmaterial

In die vorliegende Studie wurden für die Proliferations- und IL-10-Versuchsreihen insgesamt 18 Probanden rekrutiert, außerdem 11 Healthy Controls. Als positiv ist hier insbesondere die optimale Reinheit (im Mittel 0,2%) der PMN-MDSC-depletierten PBMC (PBMC-PMN-MDSC) zu werten, wodurch eine gute Vergleichbarkeit der Proben untereinander geschaffen wurde. Insgesamt ist diese Studie eher im kleinen Rahmen gehalten mit begrenzter Kohorte der an HIV-1 erkrankten Personen in der fortgeschrittenen Infektion (= *effectors*). Dies lag vor allem an der Schwierigkeit, heutzutage geeignete *effectors* zu rekrutieren. Dies sind meist Neudiagnosen, die sich mit hohen Viruslasten und niedrigen CD4-Zellzahlen vorstellen, oft, weil sie bereits eine opportunistische Infektion besitzen. Diese Patienten beginnen zumeist zügig mit einer HAART, weshalb sie nur ganz zu Beginn für die Untersuchungen zur Verfügung stehen können. Daher verzeichnen wir es durchaus als Erfolg diese Probandenzahl überhaupt erreicht zu haben. Zudem ist es für die Arbeit mit MDSC wichtig, dass diese frisch aus Vollblut entnommen und zeitnah weiterverarbeitet werden. Grützner et al. zeigten eine signifikante Reduktion der Zellzahl bei Lagerung der Proben über Nacht und bei Kryokonservierung [107].

Dies zieht nach sich, dass für jeden Versuch Patienten neu rekrutiert werden mussten. Ein weiterer Aspekt betrifft die unterschiedliche Frequenz von PMN-MDSC in verschiedenen Situationen. So ist zum Beispiel das Auftreten von PMN-MDSC auch abhängig vom Alter eines jeden Patienten. Mit Blick darauf lässt sich die ausgewählte Patientenkohorte, was das Alter betrifft, mit einer Spanne von 26 bis 74 Lebensjahren zum Erhebungszeitpunkt als relativ heterogen bezeichnen.

5.2 Mögliche methodische Fehler und Schwächen der Arbeit

Nach wie vor ist in der Literatur die Schwierigkeit beschrieben, PMN-MDSC eindeutig durch spezifische zelluläre Marker zu detektieren. So ist durch eine Vielzahl eingesetzter Marker zur Immunphänotypisierung die Zahl an unterschiedlich differenzierten MDSC-Zellpopulationen enorm gewachsen. Dieser Effekt erschwert die interne Vergleichbarkeit von Studien. Humane MDSC werden am häufigsten als CD11b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{-/low} phänotypisiert. Es existieren zahlreiche weitere Marker-Kombinationen, die unter anderem CD66b, CD16, CD83, DC-SIGN, IL4-receptor alpha (IL4Ra), VEGFR, CD34 und das S100-Protein beinhalten. Je nach Krankheitsentität werden häufig andere Marker-Kombinationen verwendet. Bei HIV werden PMN-MDSC zusätzlich als CD14⁻/CD15⁺ phänotypisiert. Zum einen wurde diese Kombination bereits in vielen größeren Studien zu PMN-MDSC angewandt. Zum anderen hat sie sich in Vorstudien und -untersuchungen innerhalb unserer Forschungsgruppe etabliert, so dass sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Bronte et al. publizierten 2016 zu diesem Thema eine Empfehlung zur einheitlichen Nomenklatur und Charakterisierung von MDSC, welche sich mit der von uns verwendeten Markerkombination für PMN-MDSC deckt [43]. Neben molekularen lassen sich PMN-MDSC auch nach funktionellen Charakteristika einteilen, wie beispielsweise ROS-, Arginase- oder Myeloperoxidase-Aktivität [53, 108, 109]. In dieser Arbeit haben wir uns allerdings auf molekulare Identifikationsmarker beschränkt.

Der Literatur sind zudem Hinweise auf mögliche Fehlerquellen bei der zellulären Separation mittels Ficoll-Dichtegradienten zu entnehmen. So ist einerseits beschrieben, dass die Dichte von PMN (engl. *polymorphonuclear leukocytes*) von den Bedingungen der Blutentnahme und Lagerung abhängig ist und hierbei starken Schwankungen unterliegt, welche letztlich die Interpretation von gewonnenen Ergebnissen beeinflussen können [71, 110]. Aus diesem Grund wurde das frisch entnommene Patientenblut umgehend weiter bearbeitet und zusätzliche Lagerung möglichst vermieden (siehe Kapitel

5.1). Da allerdings nur schwer quantifizierbar ist, ab wann bereits Abweichungen auftreten, können insbesondere bei einer kleinen Probandenkohorte schon geringfügige Veränderungen der Ergebnisse eine valide Interpretation beeinträchtigen. Da die Separation mittels Ficoll-Dichtegradient eine lang etablierte und effektive Methode unseres Labors darstellt, wurde durch standardisierte Abläufe und möglichst identische Prozessierung der Proben diesem Problem begegnet.

Andererseits gibt es Hinweise, dass der Ficoll-Dichtegradient die Expression von speziell granulozytären Oberflächenmolekülen wie CD66b und CD16 signifikant reduziert, wodurch möglicherweise weniger Zellen detektiert werden als tatsächlich im Blut vorhanden sind [111, 112]. Darüber hinaus ist bekannt, dass MDSC ein hohes Maß an intrinsischer Plastizität aufweisen. Dies bedeutet, dass bereits geringe Veränderungen in der Mikroumgebung starke Modifikationen sowohl von Phänotyp und Funktion, als auch gegenüber ihrem Reifungsprozess zu Antigen-präsentierenden Zellen bewirken können. Aus diesem Grund ist ebenfalls Vorsicht geboten bei der Interpretation von *in vitro* Experimenten, da eingesetzte Medien (u.a. FCS) teilweise einen modifizierenden Einfluss auf diese empfindlichen Zellen besitzen können.

Ein weiterer Punkt betrifft die Unterschiede von *in vitro* zu *in vivo* Experimenten. Studien an isolierten Zellpopulationen lassen häufig spezifische Aussagen über ebendiese beobachteten Zelltypen in Zusammenschau mit einem speziellen Umfeld, einer weiteren Zellgruppe oder Ähnlichem zu. Dennoch spiegelt ein solches arrangiertes Setting nicht die Bedingungen im menschlichen Organismus wieder, in dem weitere Zellen, Zytokine oder andere Mediatoren, die durch Zellisolation ausgewaschen wurden, normalerweise einen direkten Einfluss auf den zu untersuchenden Prozess nehmen können. Somit können wichtige Interaktionen bei isolierten *in vitro* Experimenten unentdeckt bleiben. In der vorliegenden Studie wurde dieser Einflussparameter zu einem großen Teil dadurch verringert, dass neben der Isolation von PMN-MDSC mit Vollblut-PBMC gearbeitet wurde, die einen Großteil der zellulären Bestandteile des Blutes ausmachen.

Als weiterer wichtiger Aspekt ist bei der Untersuchung einer isolierten Zellpopulation zu nennen, dass diese mit möglichst großer Reinheit aus dem Blut gewonnen wird. Die errechnete Reinheit bei den Ko-Inkubations-Assays lag im Mittel bei etwa 54%, variierte jedoch enorm von erzielten Reinheiten von 19% bis 95%. Im Vergleich mit der Literatur sind häufig Reinheiten von 90% bis über 95% beschrieben [45, 64, 79]. Einerseits konnten wir beobachten, dass es teilweise schwierig war die PMN-MDSC rein zu separieren, wenn ein besonders hoher Anteil von PMN-MDSC im Blut vorlag. Ein möglicher Grund könnte die Adhäsion der PMN-MDSC an Materialoberflächen oder anderen Zellen darstellen, wodurch sie sich den Separationsmechanismen (Magnet und magnetische Marker) entziehen können. Außerdem ist denkbar, dass noch häufigere

Wiederholungen der Isolationsvorgänge, nämlich mehr als der hier durchgeführten sieben Mal, zu erhöhten Reinheitswerten führen könnte.

Ebenfalls sollte der PMN-MDSC-depletierte 'Rest' (PBMC-PMN-MDSC) möglichst frei von PMN-MDSC sein, um optimale Vergleiche anstellen zu können. Diese Reinheit war im Mittel mit einem sehr guten Wert von 99,8 % gegeben. Dadurch konnte im Gegenzug eine leichte Verunreinigung der PMN-MDSC toleriert werden.

5.3 Produzieren PMN-MDSC selbst IL-10?

Da sowohl für PMN-MDSC als auch für IL-10 in der Literatur beschrieben ist, dass beide Komponenten im Rahmen chronischer Infektionskrankheiten einen immunsuppressiven Effekt bewirken und hemmenden Einfluss auf zelluläre Immunantworten und Zellinteraktionen besitzen, stellten wir die Hypothese auf, dass beide Mediatoren in ihrer Funktionsausübung miteinander in Verbindung stehen könnten. Unterstützt wurde diese Vermutung durch vereinzelt vorliegende Daten, welche die eigenständige Bildung von IL-10 durch MDSC beschrieben hatten [113, 114].

Die selbst erhobenen Messungen zur IL-10 Produktion von PMN-MDSC zeigen eindeutig (siehe Kapitel 4.1), dass PMN-MDSC im direkten Vergleich mit gesunden Kontrollen (HC) keinen wesentlich höheren intrazellulären IL-10 Gehalt besitzen. Dies lässt annehmen, dass der suppressive Charakter von PMN-MDSC nicht mithilfe der eigenen Sekretion von IL-10 ausgeübt wird. Eine weitere Überlegung ist die molekulare Ähnlichkeit der PMN-MDSC zu Granulozyten (v.a. Neutrophilen), von denen sie abstammen [115, 116]. Auch für Neutrophile ist keine eigenständige Synthese von IL-10 bekannt. Beide Zelltypen besitzen unter anderem eine ähnliche Expression bestimmter Zellmarker wie CD14, CD15 und CD16. Außerdem ist sowohl für Neutrophile als auch für PMN-MDSC die Verwendung von Arginase-1 und die Bildung von ROS charakteristisch. Pillay et al. stellten sogar die Hypothese auf, dass PMN-MDSC ein Phänotyp von Neutrophilen seien [117, 118].

Abschließend stellt sich die Frage, ob PMN-MDSC möglicherweise in der Lage sind andere Zellen, wie zum Beispiel die Monozyten als mutmaßliche Hauptproduzenten, zur IL-10 Produktion anzuregen, um damit ihre eigene Funktion besser ausüben zu können. Diese Hypothese leitet sich aus Studien von Hoechst et al. ab, welche herausfanden, dass monozytäre MDSC in der Lage sind regulatorische T-Zellen (Tregs) zur Proliferation zu stimulieren und CD4 T-Zellen zur IL-10 Produktion zu induzieren [44]. Dieser Sachverhalt wird im nachfolgenden Kapitel 5.4 aufgegriffen.

5.4 Bedeutung von IL-10 für die Funktion von PMN-MDSC bei HIV

Wie in Kapitel 5.3 bereits angedeutet, besteht weiterhin die Frage, ob PMN-MDSC, wenn auch ohne eigenständige IL-10 Produktion, ihre (immun-)suppressiven Eigenschaften unter Einfluss von IL-10 ausspielen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten (siehe Kapitel 4.3) zeigen, dass bei Anwesenheit von IL-10 innerhalb der Zellkultur die PMN-MDSC ihrer proliferationshemmenden Wirkung einwandfrei nachgehen. Unter Blockierung des Zytokinrezeptors scheint dies nicht mehr problemlos zu funktionieren, sodass sich die Proliferation der CD8 T-Zellen teilweise trotz Anwesenheit von PMN-MDSC wiederherstellte. Es lässt sich resümieren, dass eine Blockade des IL-10 Rezeptors mit erhöhtem messbaren (aber funktionell unwirksamen) IL-10 Gehalt einhergeht, was gleichzeitig positiv mit einer abgeschwächten PMN-MDSC Funktion korreliert. Diese Tatsache führt im Umkehrschluss zu der Hypothese, dass unter gleichzeitiger Anwesenheit von PMN-MDSC und intaktem IL-10 Rezeptor eine bessere immunsuppressive Wirkung durch funktionellen Synergismus erzielt werden kann als unter alleiniger Anwesenheit von PMN-MDSC. Da die gewonnenen Ergebnisse allerdings sehr heterogen und kaum signifikant waren, postulieren wir, dass IL-10 für die Wirkung von PMN-MDSC keine direkte Bedeutung hat, ebensowenig wie es von PMN-MDSC gebildet wird. Wie in Kapitel 5.3 bereits erörtert wurde, kommt diese Aufgabe aller Wahrscheinlichkeit nach der großen Gruppe der Monozyten zu. Ebenfalls muss zu diesem Thema noch geklärt werden, ob HIV-spezifische PMN-MDSC, wie in anderen Krankheitssettings beschrieben, auch in der chronischen HIV-1 Infektion fähig sind andere Immunzellen zur IL-10 Produktion zu stimulieren [44]. Darüber hinaus ist interessant, dass innerhalb der Zellkulturen mit PMN-MDSC das IL-10 in geringerer Zahl gemessen wurde, was gegebenenfalls einen Verbrauch von IL-10 impliziert (siehe Kapitel 5.5).

Eher gegen die Annahme, dass PMN-MDSC und IL-10 gemeinsam innerhalb der chronischen HIV-1 Infektion fungieren, sprechen allerdings Daten am LCMV-Mausmodell (Mäuse infiziert mit *Lymphozytäre Choriomeningitis-Virus*). Hierbei wurde nachgewiesen, dass IL-10 zwar direkt CD4 T-Zell-Antworten hemmt, jedoch keine CD8 T-Zell-Antworten, welche einer der wichtigsten Targets für PMN-MDSC darstellen [29, 119]. Möglicherweise ist jedoch diese MDSC-Population aufgrund der Speziesunterschiede nicht mit derjenigen in dieser Arbeit vergleichbar. Huang et al. fanden ferner am Mausmodell heraus, dass MDSC in ihrer Funktion regulatorische T-Zellen zu aktivieren unter anderem auf die gleichzeitige Anwesenheit von IL-10 angewiesen sind [120]. Außerdem entdeckten Liu et al., dass das Auftreten von IL-10 produzierenden regulatorischen B-Zellen (Bregs) bei Patienten mit Lungen-Karzinom positiv mit dem Auftreten von MDSC (allerdings CD14⁺ Subtyp) und dem Krankheitsprogress korrelierte [121].

Viele dieser Informationen leiten zu der Annahme, dass offensichtlich ein funktioneller Zusammenhang zwischen PMN-MDSC, IL-10 und möglicherweise einer weiteren, IL-10 produzierenden Zellpopulation besteht. Eine direkte Interaktion konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Lediglich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die IL-10 Rezeptorblockade die inhibitorische Wirkung der PMN-MDSC teilweise einzudämmen scheint. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anwesenheit von IL-10 allgemein einen positiven, begünstigenden Einfluss auf die Funktion von PMN-MDSC besitzt.

5.5 IL-10 Verlust während Funktionsausübung durch PMN-MDSC

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in den Zellkulturen mit Anwesenheit von PMN-MDSC stets weniger IL-10 in den Überständen gemessen wurde als ohne diese Zellpopulation. Einerseits ist anzunehmen, dass die IL-10 Messung proportional von der Zahl der spontan IL-10 bildenden Zellen abhängig ist. Somit führt die Proliferationshemmung durch PMN-MDSC zu einer verminderten Zellzahl an PBMC innerhalb der Zellkultur und folglich zu einem geringeren absoluten IL-10 Gehalt. Darüber hinaus sind in den PBMC-PMN-MDSC-Wells noch Monozyten enthalten, die bekanntlich (siehe Kapitel 5.3) IL-10 synthetisieren können, und somit für die erhöhten IL-10 Werte verantwortlich sein können. Eine andere Hypothese ist, dass vorhandenes IL-10 zur Ausübung hemmender Effekte oder Ähnlichem durch PMN-MDSC auf irgendeine Art verbraucht wird. Zu dieser Thematik sind jedoch bisher keine Hinweise in der Literatur zu finden.

Ob der verringerte IL-10 Gehalt innerhalb der PMN-MDSC- im Vergleich zu den PBMC-PMN-MDSC-Zellkulturen nun von der geringeren Zellproliferation abhängt oder der erhöhten IL-10 Produktion durch Monozyten in den anderen Wells oder ein Verbrauch stattfindet, ist somit bisher nicht eindeutig zu belegen. Darüber hinaus obliegt dieser Sachverhalt nicht weniger durch die spärlich vorliegende Literatur auf diesem Gebiet bisher lediglich Spekulationen.

5.6 Klinische Bedeutung und Ausblick

Im Rahmen der chronischen HIV-1 Infektion korrelieren PMN-MDSC positiv mit dem Krankheitsprogress, der Viruslast und dem CD4 T-Zell-Verfall. Außerdem supprimieren PMN-MDSC nachweislich CD8 T-Zell-Antworten im HIV-Setting. Ähnlich verhält es sich

mit IL-10, welches durch seine immunsuppressiven Eigenschaften die allgemeine Immunerschöpfung und damit das Fortschreiten der Infektion fördert.

Mit der vorliegenden Arbeit fanden wir heraus, dass IL-10 und PMN-MDSC innerhalb der chronischen HIV-1 Infektion ein komplexes Wirkprofil besitzen. Es wurde dennoch im Rahmen dieser Arbeit postuliert, dass IL-10 für die Funktion von PMN-MDSC, welche IL-10 nicht eigenständig produzieren, keine Rolle spielt.

Bei mehreren Krankheitsentitäten standen bereits PMN-MDSC und IL-10 als therapeutische Targets im Fokus. In der chronischen HIV-1 Infektion fallen nach Beginn einer HAART die MDSC-Zahlen im peripheren Blut rapide ab, was am ehesten durch die ebenfalls absinkende Virämie durch Einsatz der herkömmlichen HIV-Medikamente begründet ist [29]. Neben IL-10 und PMN-MDSC stellen auch zahlreiche weitere Faktoren wichtige Bestandteile innerhalb dieses Krankheitsprozesses dar. Die Kenntnis über die einzelnen Vorgänge bildet die Grundlage zum umfassenden Verständnis der Infektion. Gleichzeitig kann jede beteiligte Immunreaktion separat ein mögliches Target zur individuellen therapeutischen Intervention repräsentieren. Die erarbeiteten Resultate legen nahe, dass die Antikörper-gesteuerte IL-10 Rezeptor-Blockade CD8 T-Zell-Antworten in der chronischen HIV-1 Infektion wiederherstellen und tendenziell PMN-MDSC in ihrer Funktion einschränken kann. Vorteile einer Therapie, welche zur Steigerung der Immunkompetenz auf körpereigene Faktoren abzielt, ist die geringere Anfälligkeit gegenüber Resistenzbewegungen von Seiten des Virus [122]. Dennoch muss bedacht werden, dass körpereigene Stoffe (wie IL-10) häufig an multiplen Stellen des Organismus Aufgaben übernehmen. Daher kann die Hemmung des Zytokins nicht nur die Immunantwort auf das HI-Virus betreffen, sondern alle IL-10-abhängigen Prozesse des Körpers beeinflussen.

Die IL-10 Blockade mittels Antikörpern könnte eine Option zur Kombinationstherapie mit derzeit verwendeten HAART-Medikamenten für eine effizientere Viruselimination in der chronischen HIV-Infektion darstellen. Als eigenständige Alternative ist diese Option sicherlich bisher noch nicht effektiv genug, da sie im Rahmen der PMN-MDSC Wirkungen einen zu kleinen Bereich des komplexen Prozesses der chronischen HIV-1 Infektion abdeckt.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Barré-Sinoussi et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: *Science* (1983).
- [2] R. C. Gallo et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. In: *Science* (1984).
- [3] T. Zhu et al. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. In: *Nature* (1998).
- [4] B. H. Hahn et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. In: *Science* (2000).
- [5] P. M. Sharp et al. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? In: *The Royal Society* (2001).
- [6] M. S. Gottlieb. Epidemiologic Notes and Reports Epidemiologic Notes and Reports: Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. In: (1981).
- [7] U. Hurtenbach & G. M. Shearer. Germ cell-induced immune suppression in mice. Effect of inoculation of syngeneic spermatozoa on cell-mediated immune responses. In: *Journal of Experimental Medicine* 155 (1982), S. 1719–1729.
- [8] F. Clavel et al. Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. In: (1986).
- [9] P. B. Gilbert et al. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. In: *Statistics in Medicine* 22 (2003), S. 573–593.
- [10] C. Janeway & K. P. Murphy, Hrsg. *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl, 2009. ISBN: 9783827420473.
- [11] K. H. Roux & K. A. Taylor. AIDS virus envelope spike structure. In: *Current Opinion in Structural Biology* 17.2 (2007), S. 244–252.

- [12] P. Zhu et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. In: *Nature* 441.7095 (2006), S. 847–852.
- [13] K. Arastéh, Hrsg. *Duale Reihe - Innere Medizin: 1060 Abbildungen*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2013. ISBN: 9783131181633.
- [14] V. Mehraj et al. Immune Suppression by Myeloid Cells in HIV Infection: New Targets for Immunotherapy. In: *The Open AIDS Journal* 8 (2014), S. 66–78.
- [15] M. Wolbers et al. Pretreatment CD4 Cell Slope and Progression to AIDS or Death in HIV-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy—The CASCADe Collaboration: A Collaboration of 23 Cohort Studies. In: *PLoS Medicine* 7.2 (2010), e1000239.
- [16] D. S. Kwon et al. CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Impair HIV-1-Specific CD4 T Cell Responses by Upregulating Interleukin-10 Production in Monocytes. In: (2012).
- [17] R. Draenert et al. Persistent Recognition of Autologous Virus by High-Avidity CD8 T Cells in Chronic, Progressive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. In: *Journal of Virology* 78.2 (2004), S. 630–641.
- [18] M. R. Betts et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. In: *Blood* 107.12 (2006), S. 4781–4789.
- [19] H. Shin & E. J. Wherry. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. In: *Current Opinion in Immunology* 19.4 (2007), S. 408–415.
- [20] UNAIDS. AIDS by the numbers 2015. In: (2015).
- [21] C. Hoffmann & J. K. Rockstroh, Hrsg. *HIV 2014/15*. Hamburg, 2014. ISBN: 9783941727151.
- [22] MSD SHARP & DOHME GmbH. HIV: Infektion. 2015. URL: <http://www.msd-gesundheit.de/hiv/symptome/drei-stadien-hiv-infektion/>.
- [23] P. Serafini. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. In: *Immunologic Research* 57.1-3 (2013), S. 172–184.

- [24] S. D. Blackburn & E. J. Wherry. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. In: *Trends in Microbiology* 15.4 (2007), S. 143–146.
- [25] F. Plata et al. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. In: *Nature* (1987), S. 348–351.
- [26] Chakrabarti S. et al Walker B. D. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. In: *Nature* (1987), S. 345–348.
- [27] M. Lichterfeld et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T Cell Proliferation after Acute HIV-1 Infection and Restoration by Vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T Cells. In: *Journal of Experimental Medicine* 200.6 (2004), S. 701–712.
- [28] S. A. Migueles et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. In: *Nature Immunology* 3.11 (2002), S. 1061–1068.
- [29] T. Vollbrecht et al. Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. In: *AIDS* 26.12 (2012), F31–F37.
- [30] S. Strober. Natural Suppressor (NS) Cells, Neonatal Tolerance, and Total Lymphoid Irradiation: Exploring Obscure Relationships. In: (1984).
- [31] B. Almand et al. Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. In: *The Journal of Immunology* 166.1 (2001), S. 678–689.
- [32] V. Bronte et al. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. In: *Blood* (2000), S. 3838–3846.
- [33] K. Young, M. A. Wright & D. I. Gabrilovich. Chemoattraction of femoral CD34+ progenitor cells by tumor-derived vascular endothelial cell growth factor. In: *Clin Exp Metastasis* 17(10) (1999), S. 881–888.
- [34] A. Garg & S. A. Spector. HIV Type 1 gp120-Induced Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Is Dependent on Interleukin 6 and Suppresses Immunity. In: *Journal of Infectious Diseases* 209.3 (2014), S. 441–451.
- [35] M. G. Lechner, D. J. Liebertz & A. L. Epstein. Characterization of Cytokine-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells from Normal Human Peripheral

- Blood Mononuclear Cells. In: *The Journal of Immunology* 185.4 (2010), S. 2273–2284.
- [36] D. I. Gabrilovich & S. Nagaraj. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. In: *Nature Reviews Immunology* 9.3 (2009), S. 162–174.
- [37] P. Sinha et al. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. In: *The Journal of Immunology* 179.2 (2007), S. 977–983.
- [38] D. I. Gabrilovich et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. In: *Cancer Research* (2007).
- [39] A. C. Ochoa et al. Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma. In: *Clinical Cancer Research* 13.2 (2007), 721s–726s.
- [40] J.-I. Youn et al. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. In: *The Journal of Immunology* 181.8 (2008), S. 5791–5802.
- [41] K. Movahedi et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. In: *Blood* 111.8 (2008), S. 4233–4244.
- [42] E. Peranzoni et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. In: *Current Opinion in Immunology* 22.2 (2010), S. 238–244.
- [43] Vincenzo Bronte et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. In: *Nature Communications* 7 (2016), S. 12150.
- [44] B. Hoechst et al. A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. In: *Gastroenterology* 135.1 (2008), S. 234–243.
- [45] M. G. Lechner et al. Functional characterization of human Cd33+ And Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. In: (2011).
- [46] A. G. Cuenca et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. In: *Molecular Medicine* 17.3-4 (2011), S. 1.

- [47] V. P. Makarenkova et al. CD11b+/Gr-1+ Myeloid Suppressor Cells Cause T Cell Dysfunction after Traumatic Stress. In: *The Journal of Immunology* 176.4 (2006), S. 2085–2094.
- [48] T. Wu, Yang. Zhao & Yong Zhao. The roles of myeloid-derived suppressor cells in transplantation. In: *Expert Review of Clinical Immunology* 10.10 (2014), S. 1385–1394.
- [49] S. L. Highfill et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. In: *Blood* 116.25 (2010), S. 5738–5747.
- [50] Y.-J. Kim, S.-Y. Chang & H.-J. Ko. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Inflammatory Bowel Disease. In: *Intestinal Research* 13.2 (2015), S. 105.
- [51] O. Draghiciu et al. Myeloid derived suppressor cells—An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. In: (2015).
- [52] L. S. Cauley et al. Superantigen-Induced CD4 T Cell Tolerance Mediated by Myeloid Cells and IFN-. In: *The Journal of Immunology* 165.11 (2000), S. 6056–6066.
- [53] T. F. Greten, M. P. Manns & F. Korangy. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. In: *International Immunopharmacology* 11.7 (2011), S. 802–807.
- [54] C. P. Verschoor et al. Blood CD33(+)HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. In: *Journal of Leukocyte Biology* 93.4 (2013), S. 633–637.
- [55] S. Gaupp et al. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in CCR2-/- Mice, Susceptibility in Multiple Strains. In: *American Journal of Pathology* 1 (2003), S. 139–150.
- [56] I. L. King, T. L. Dickendesher & B. M. Segal. Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. In: *Blood* 113.14 (2009), S. 3190–3197.

- [57] B. Zhu et al. CD11b+Ly-6Chi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *The Journal of Immunology* 179.8 (2007), S. 5228–5237.
- [58] Q. Guan et al. The role and potential therapeutic application of myeloid-derived suppressor cells in TNBS-induced colitis. In: *Journal of Leukocyte Biology* 94.4 (2013), S. 803–811.
- [59] D. V. Ostanin et al. Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188.3 (2012), S. 1491–1502.
- [60] A. Kappeler & C. Mueller. The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. In: *Histology and Histopathology* 15(1) (2000), S. 167–172.
- [61] L. A. Haile et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. In: *Gastroenterology* 135.3 (2008), 871–81, 881.e1–5.
- [62] J. G. Cripps & J. D. Gorham. MDSC in autoimmunity. In: *International Immunopharmacology* 11.7 (2011), S. 789–793.
- [63] S. Gantt et al. The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny. In: (2014).
- [64] A. Gervassi et al. Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses. In: *PLoS ONE* 9.9 (2014), e107816.
- [65] N. Rieber et al. Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. In: *Clinical and experimental immunology* 174.1 (2013), S. 45–52.
- [66] G. R. Hill et al. Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host-Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. In: *Blood* 90 (1997), S. 3204–3213.
- [67] V. K. Singh et al. Role of radiation-induced granulocyte colony-stimulating factor in recovery from whole body gamma-irradiation. In: *Cytokine* 58.3 (2012), S. 406–414.

- [68] M. Rodriguez Garcia et al. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 120.7 (2010), S. 2486–2496.
- [69] F. Meng et al. Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. In: *Inflammation* 37.5 (2014), S. 1799–1805.
- [70] D. Adeegbe et al. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. In: *Cell transplantation* 20.6 (2011), S. 941–954.
- [71] D. Marvel & D. I. Gabrilovich. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. In: *Journal of Clinical Investigation* 125.9 (2015), S. 3356–3364.
- [72] H. H. Yan et al. Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells Tip the Balance of Immune Protection to Tumor Promotion in the Premetastatic Lung. In: *Cancer Research* 70.15 (2010), S. 6139–6149.
- [73] M. Chioda et al. Myeloid cell diversification and complexity: an old concept with new turns in oncology. In: *Cancer and Metastasis Reviews* 30.1 (2011), S. 27–43.
- [74] T. J. Curiel et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. In: *Nature Medicine* 10.9 (2004), S. 942–949.
- [75] W. Zou. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. In: *Nature Reviews Immunology* 6.4 (2006), S. 295–307.
- [76] T. J. Curiel et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. In: *Nature Medicine* 9.5 (2003), S. 562–567.
- [77] W. Zou. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. In: *Nature Reviews Cancer* 5.4 (2005), S. 263–274.
- [78] J. Nonnenmann et al. Lack of Significant Elevation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Peripheral Blood of Chronically Hepatitis C Virus-Infected Individuals. In: *Journal of Virology* 88.13 (2014), S. 7678–7682.

- [79] Nicola Tumino et al. In HIV-positive patients, myeloid-derived suppressor cells induce T-cell anergy by suppressing CD3 ζ expression through ELF-1 inhibition. In: *AIDS* 29.18 (2015), S. 2397–2407.
- [80] Sandra E. Dross et al. Kinetics of Myeloid-Derived Suppressor Cell Frequency and Function during Simian Immunodeficiency Virus Infection, Combination Antiretroviral Therapy, and Treatment Interruption. In: *The Journal of Immunology* 198.2 (2017), S. 757–766.
- [81] Ling Wang et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals. In: *AIDS* 30.10 (2016), S. 1521–1531. ISSN: 0269-9370.
- [82] D. F. Fiorentino, M. W. Bond & Mosmann T. R. Two types of mouse T helper Cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. In: *Journal of Experimental Medicine* 170 (1989), S. 2081–2095.
- [83] K. W. Moore et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. In: *Annu Rev Immunol* 19 (2001), S. 683–765.
- [84] C. Schoenbein et al. Long-term interleukin-10 presence induces the development of a novel, monocyte-derived cell type. In: (2007).
- [85] S. Subramanian Iyer & Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. In: (2012).
- [86] W. Ouyang et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. In: *Annual Review of Immunology* 29.1 (2011), S. 71–109.
- [87] K. N. Couper, D. G. Blount & E. M. Riley. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. In: *The Journal of Immunology* 180.9 (2008), S. 5771–5777.
- [88] B. L. Kelsall & F. Leon. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. In: *Immunol Rev* 206 (2005), S. 132–148.
- [89] OF. Beser et al. Clinical Features of Interleukin 10 Receptor Gene Mutations in Children With Very Early–Onset Inflammatory Bowel Disease. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 60.3 (2015), S. 332–338.

- [90] A. Franke et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. In: *Nature Genetics* 40.11 (2008), S. 1319–1323.
- [91] S. S. Kang & P. M. Allen. Priming in the Presence of IL-10 Results in Direct Enhancement of CD8+ T Cell Primary Responses and Inhibition of Secondary Responses. In: *The Journal of Immunology* 174.9 (2005), S. 5382–5389.
- [92] C. Erikstrup et al. Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 -1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. In: *AIDS (London, England)* 21.17 (2007), S. 2283–2291.
- [93] M. A. Brockman et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. In: *Blood* 114.2 (2009), S. 346–356.
- [94] E. Stylianou et al. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression—down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. In: *Clin Exp Immunol* 116 (1999), S. 115–120.
- [95] E. A. Said et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. In: *Nature medicine* 16.4 (2010), S. 452–459.
- [96] S. Buisson et al. Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. In: *The Journal of infectious diseases* 199.12 (2009), S. 1862–1871.
- [97] H. D. Shin et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), S. 14467–14472.
- [98] H. Yang et al. Interleukin-10 responses to therapeutic vaccination during highly active antiretroviral therapy and after analytical therapy interruption. In: *AIDS* 23 (2009), S. 2226–2230.
- [99] D. D. Naicker et al. Interleukin-10 Promoter Polymorphisms Influence HIV-1 Susceptibility and Primary HIV-1 Pathogenesis. In: (2009).

- [100] Yan Wang & Andrew P. Rice. Interleukin-10 inhibits HIV-1 LTR-directed gene expression in human macrophages through the induction of cyclin T1 proteolysis. In: *Virology* 352.2 (2006), S. 485–492.
- [101] T. Tanikawa et al. Interleukin-10 Ablation Promotes Tumor Development, Growth, and Metastasis. In: *Cancer Research* 72.2 (2012), S. 420–429.
- [102] M. J. Delano et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. In: *The Journal of experimental medicine* 204.6 (2007), S. 1463–1474.
- [103] A. Kotsakis et al. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. In: *Journal of Immunological Methods* 381.1-2 (2012), S. 14–22.
- [104] C. R. Parish. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. In: *Immunology and cell biology* 77.6 (1999), S. 499–508.
- [105] T. Jung et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. In: *Journal of Immunological Methods* 159 (1993), S. 197–207.
- [106] BioLegend. Protocols - Sandwich ELISA. 2016. URL: <http://www.biolegend.com/elisa>.
- [107] Eva Gruetzner et al. Kinetics of human myeloid-derived suppressor cells after blood draw. In: *Journal of Translational Medicine* 14.1 (2016), S. 802.
- [108] C. A. Dumitru et al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61.8 (2012), S. 1155–1167.
- [109] B. J.C Macatangay, A. L. Landay & C. R. Rinaldo. MDSC: a new player in HIV immunopathogenesis. In: *AIDS* 26.12 (2012), S. 1567–1569.
- [110] S. Trellakis et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. In: *Innate immunity* 19.3 (2013), S. 328–336.

- [111] L. Zhou et al. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 19.7 (2012), S. 1065–1074.
- [112] V. Damuzzo et al. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. In: (2015).
- [113] K. M. Hart et al. IL-10 Immunomodulation of Myeloid Cells Regulates a Murine Model of Ovarian Cancer. In: *Frontiers in Immunology* 2 (2011).
- [114] S. L. Poe et al. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferycytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. In: *Mucosal Immunology* 6.1 (2012), S. 189–199.
- [115] Claudia A. Dumitru et al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61.8 (2012), S. 1155–1167.
- [116] C. Luckner-Minden et al. Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase. In: *Journal of Leukocyte Biology* 87.6 (2010), S. 1125–1132.
- [117] Janesh Pillay et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 70.20 (2013), S. 3813–3827.
- [118] S. L. Highfill et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. In: *Blood* 116.25 (2010), S. 5738–5747.
- [119] D. G. Brooks et al. IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.7 (2010), S. 3018–3023.
- [120] B. Huang et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. In: *Cancer Research* 66.2 (2006), S. 1123–1131.

- [121] J. Liu et al. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg and MDSC cells in Non Small Cell Lung Carcinoma patients. In: *Human immunology* 77.1 (2016), S. 84–89.
- [122] E. B. Wilson & D. G. Brooks. The Role of IL-10 in Regulating Immunity to Persistent Viral Infections. In: *Negative Co-Receptors and Ligands*. Hrsg. von R. Ahmed & T. Honjo. Bd. 350. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin & Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, S. 39–65.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau des HIV-1	3
1.2	RNA-Genom von HIV-1	4
1.3	Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie	6
1.4	Übersicht der wichtigsten Funktionen von Interleukin-10	14
3.1	Übersicht der einzelnen Versuchsschritte	25
3.2	PBMC-Isolierung durch Dichtezentrifugation mithilfe von Ficoll®	27
3.3	Anordnung der Zellkulturen auf der 24-Well-Platte	31
3.4	Gating der PMN-MDSC Population zur IL-10 Messung	33
3.5	Festlegung des Cut-offs zur IL-10 Positivität mithilfe einer Isotype Control	33
3.6	Bestimmung des IL-10 ⁺ und IL-10 ⁻ PMN-MDSC Anteils	34
3.7	Gating der MDSC-Population innerhalb der <i>effector</i> PBMC.	35
3.8	Gating der CD8 ⁺ Population in den PBMC der <i>targets</i>	36
3.9	Zusammenfassung des Ablaufs des Human IL-10 ELISA Tests	37
4.1	Gegenüberstellung der spontanen IL-10 Produktion der PMN-MDSC von HCs und HIV-Patienten ex vivo	38
4.2	Hemmung der CD8 T-Zell-Proliferation durch <i>effector</i> PMN-MDSC	39
4.3	Vergleich der quantitativen Proliferation der CD8 T-Zellen unter Stimula- tion mit PHA und GagNef-Peptiden	40
4.4	Vergleich der Proliferation mit und ohne Zugabe des IL-10-R α -ABs unter PHA- und GagNef-Stimulation	42
4.5	Vergleich der IFN γ Produktion von PBMC-PMN-MDSC mit und ohne IL- 10-R α -AB (PHA und GagNef)	43
4.6	Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie eines exemplari- schen Assays zur CD8 Zell-Proliferation	45
4.7	Ko-Inkubation von CD8 T-Zellen (target cells) mit und ohne Zugabe von PMN-MDSC (effector cells) und unter Einsatz von IL-10-R α -AB (PHA- stimuliert)	46

4.8 Ko-Inkubation von CD8 T-Zellen (target cells) mit und ohne Zugabe von PMN-MDSC effector cells und unter Einsatz von IL-10-R α -AB (GagNef-stimuliert)	47
4.9 Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur IFN γ Produktion .	49
4.10 Spontane IFN γ Produktion der CD8 ⁺ Zellen von HIV-Patienten (PHA-stimuliert)	50
4.11 Spontane IFN γ Produktion der CD8 ⁺ Zellen von HIV-Patienten (GagNef-stimuliert)	51
4.12 IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen (PHA-Assays)	52
4.13 IL-10 Gehalt in Zellkultur-Überständen (GagNef-Assays)	53
4.14 Übersicht absoluter IL-10 Gehalt in den Zellkultur-Überständen	54

Tabellenverzeichnis

2.1	Auflistung der verwendeten Antikörper	19
2.2	Gag-Peptide	20
2.3	Nef-Peptide	21
3.1	Übersicht der target und effector cells für die Proliferationsassays und die Messungen zur IL-10 Synthese	24

Patientenaufklärung



KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

CAMPUS INNENSTADT

MEDIZINISCHE POLIKLINIK
Lehrstuhl Nephrologie / Hypertonologie
Komm. Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke



Klinikum der Universität München · Campus Innenstadt PD Dr. med. R. Draenert
Medizinische Poliklinik, Infektionsabteilung, Pettenkoferstraße 8a · 80336 München

Infektionsabteilung
PD Dr. R. Draenert

Sekretariat: Fr. S. Heinzmann
Tel. +49 (0)89 4400 –53550
Fax +49 (0)89 4400 –53593
E-Mail: Susanne.Heinzmann@
med.uni-muenchen.de

Internet:
mpk.klinikum.med.uni-muenchen.de
http://www.lrz-muenchen.de/~HIV_Ambulanz/

Postanschrift:
Pettenkoferstraße 8a
80336 München

Patienten-/Probandenaufklärung und Einwilligungserklärung

Studientitel: Untersuchung von Vorkommen und Bedeutung von myeloid derived suppressor cells (MDSC) in der HIV- und Hepatitis C bzw. Hepatitis B (Hep C/B)-Infektion

Studienleiterin: Priv.-Doz. Dr. med. Rika Draenert

Studienzweck:

Wir bitten um Ihr Einverständnis, an einer wissenschaftlichen Studie teilzunehmen. Der Zweck dieser Studie ist zu verstehen, warum das körpereigene Immunsystem es nicht schafft, die HIV- bzw. Hep C/B-Infektion ohne Medikamente zu kontrollieren. Das Immunsystem besteht aus verschiedenen Organen und seine Aufgabe ist es, dem Körper zu helfen, sich gegen Krankheiten zu wehren. Am Anfang der HIV- bzw. Hep C/B-Infektion wird das Virus bei den meisten Patienten gut vom Immunsystem kontrolliert. Im Verlauf der Erkrankung ist dies jedoch immer weniger möglich. Obwohl wir bereits wissen, welche Zellen besonders wichtig für die Kontrolle von HIV bzw. Hep C/B sind (=CD8 T-Lymphozyten), wissen wir nicht, warum sie im Laufe der Erkrankung ihre Funktion verlieren.

Ziel unserer Untersuchungen ist herauszufinden, warum die CD8 T-Lymphozyten im Laufe der HIV- bzw. Hep C/B-Infektion immer weniger funktionsfähig werden. Eine Möglichkeit ist, dass es bestimmte Zellen (=MDSC) gibt, die die Funktion hemmen. Aus Ihrem Blut werden wir diese MDSC-Zellen untersuchen, die evtl. dafür verantwortlich sind, dass das Immunsystem seine Aufgaben nicht richtig ausüben kann.

Sie werden gefragt, weil Sie in eine der folgenden Gruppen fallen:

- Sie sind eine nicht infizierte Kontrollperson; oder
- Sie sind HIV-infiziert; oder
- Sie sind Hepatitis B/C infiziert

Die folgenden Tests können mit Ihrem Blut gemacht werden:

- Messen, wie viel MDSC-Zellen in Ihrem Blut sind
- HIV- bzw. Hep C/B-Viruslast: Messung der Menge an HIV- bzw. Hep C/B-Virus in Ihrem Blut

- CD8-T- und CD4-T-Zellantworten: Messung, ob Ihre Blutzellen HIV, Hep C/B-Viren oder andere Viren abtöten können oder andere Botenstoffe produzieren können, wenn sie HIV bzw. Hep C/B Viren erkennen
- B-Zelllinien: bestimmte Immunzellen (= B-Lymphozyten) werden in Kultur für lange Zeit gezüchtet
- HLA-Typisierung: Bestimmung von Eiweißkörpern auf Ihren Zellen, deren Funktion es ist, dem Immunsystem zu helfen, Fremdstoffe zu erkennen
- Blutbild: Test, um festzustellen, wie viele weiße und rote Blutkörperchen Sie haben

Studienkontakt:

Studienleiterin ist Frau PD Dr. med. Rika Draenert, die unter der Telefonnummer 089-4400 57578 erreicht werden kann.

Studienablauf:

Wenn Sie einverstanden sind an dieser Studie teilzunehmen, dann wird Ihnen 36ml Blut abgenommen. Die Haut über der Einstichstelle wird desinfiziert. Eine Nadel wird in die Vene eingeführt und das Blut in spezielle Blutröhrchen abgenommen.

Im Labor wird Ihr Blut auf Immunantworten und Eigenschaften des HIV- bzw. Hep C/B-Virus untersucht.

Medizinische Information wird eventuell aus Ihrer Akte entnommen und Forschern, die Ihr Blut untersuchen, mitgeteilt. Informationen, die für diesen Zweck entnommen werden, können enthalten: Laborergebnisse, Medikamente, Vorerkrankungen und den Zeitpunkt der HIV- bzw. Hep C/B-Infektion. Ihr Blut und auch die medizinische Information wird mit einer Nummer kodiert, sodass Ihr Name nicht bekannt wird. Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert) weitergegeben, d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: PD Dr. med. R. Draenert; Renate Stirner. Beide unterstehen der ärztlichen Schweigepflicht. Gründe für die Entschlüsselung sind die Notwendigkeit, klinische Daten mit den Laborergebnissen zu korrelieren oder eine weitere Blutprobe von Ihnen einzuholen. Die Unterlagen werden in der Infektionsambulanz der Medizinischen Poliklinik für mindestens 20 Jahre aufbewahrt.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig und Sie können Ihr Einverständnis jederzeit und ohne Angabe von Gründen zurückziehen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen.

Es ist möglich, dass die Forscher weitere Blutproben möchten in der Zukunft. Wenn dies der Fall ist, werden Sie vom Studienleiter kontaktiert und gefragt, ob Sie bereit sind, nochmals Blut zu geben. Sie haben die Wahl dies abzulehnen. Wenn Sie zustimmen, wird nicht häufiger als 4-mal pro Jahr Blut abgenommen. Wenn Sie einverstanden sind, mehr als einmal Blut zu geben, werden wir nicht mehr als 100ml Blut bei einer Blutentnahme abnehmen (das entspricht sehr viel weniger als einer Blutspende für Bluttransfusionen).

Sind Sie bereit, zusätzlich Blut zu geben? Es steht Ihnen frei, diese Bitte abzulehnen. Ihre Teilnahme ist absolut freiwillig und Sie können sie jederzeit zurücknehmen.

_____ Ja _____ Nein

Wir möchten Sie um Erlaubnis bitten, Sie auch für zukünftige Studien kontaktieren zu dürfen. Sind Sie damit einverstanden, dass wir Sie für zukünftige Studien ansprechen?

_____ Ja _____ Nein

Lagerung von Blutproben:

Teile der Blutprobe, die Sie abgeben, werden eventuell eingefroren, um für zukünftige immunologische Studien zur Verfügung zu stehen. Sie werden für bis zu 20 Jahre gelagert. Ihre Blutprobe wird nur für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden. Sie wird nicht verkauft oder zur Herstellung eines kommerziellen Produktes verwendet werden. Evtl. werden sie im Rahmen von Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern auch an andere Labors weitergegeben. Jedoch werden die Proben in diesem Fall nur mit Code versehen weitergegeben. Die nicht zu unserer Arbeitsgruppe gehörenden Wissenschaftler werden keine Möglichkeit haben, den Code aufzuheben. Wir werden keine human-genetischen Tests an Ihrer Blutprobe durchführen, abgesehen von denen, die in diesem Aufklärungsschreiben genannt sind. Im Rahmen der Lagerung der Blutproben werden auch klinische Daten (Helferzellen, Viruslast, HIV- bzw. Hep C/B-Therapie) in einem Datenblatt gespeichert.

Ihre Blutprobe wird mit einer Nummer versehen, sodass Ihr Name nicht erkennbar ist. Wenn es für die Auswertung von Ergebnissen notwendig ist, wird über den Code auch eine Zuordnung zu Ihrem Namen und Ihrer Krankenakte möglich sein. Diese Zuordnung kann nur von der Projektleiterin PD Dr. Rika Draenert oder der Laborleitung Renate Stirner durchgeführt werden. Zugang zu den Daten bekommen nur direkte Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (Doktoranden, Postdocs und MTAs). Ergebnisse von zukünftigen Studien mit Ihrer Blutprobe werden eventuell in einer Zeitschrift veröffentlicht. Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet. Gerne informieren wir Sie auf Ihren Wunsch hin über Ergebnisse der Untersuchungen. Sollten sich aus den Ergebnissen Patentanmeldungen oder eine gewerbliche Nutzung ergeben, haben Sie jedoch keine Rechte darauf.

Die Lagerung der Proben erfolgt nur, wenn sie damit einverstanden sind. Die gelagerten Blutproben werden auf Ihren Wunsch jederzeit vernichtet. Sollten Sie sich gegen die Lagerung von Blutproben entscheiden, wird Ihnen daraus kein Nachteil für die weitere Behandlung in unserer Ambulanz entstehen.

Ich bin einverstanden, dass mein Blut für zukünftige Studien verwendet wird (wie oben beschrieben).

_____ Ja _____ Nein

Es entstehen Ihnen keine Kosten für die Untersuchungen für diese Studie. Für Ihre regelmäßige medizinische Versorgung ist jedoch weiterhin Ihre Krankenkasse verantwortlich.

Risiken:

Eine Blutentnahme kann ein Hämatom (= blauen Fleck) oder eine kurze Blutung an der Einstichstelle verursachen. Gelegentlich kann sich die Person, der Blut abgenommen wird,

schwindelig fühlen. Extrem selten kann es zu einer Infektion an der Einstichstelle kommen, welche durch uns behandelt werden würde.

Vorteile:

Durch Teilnahme an dieser Studie entstehen Ihnen keine direkten Vorteile. Es ist möglich, dass die Ergebnisse dieser Studie dazu führen, dass die Immunantwort auf HIV bzw. Hep C/B verbessert wird und dass eine Impfung gefunden wird. Aber es gibt keine Garantie, dass dies auch passieren wird.

Es wird keine Aufwandsentschädigung anfallen.

Alternativen:

Ihre Entscheidung an dieser Studie teilzunehmen ist freiwillig. Ihre Alternative ist, nicht an der Studie teilzunehmen. Ob Sie sich für oder gegen die Studie entscheiden, wird Ihre Behandlung an der Medizinischen Poliklinik in keiner Weise beeinflussen. Im Falle Ihres Widerrufs der Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten vernichtet.

Einwilligungserklärung

Studientitel: Untersuchung von Vorkommen und Bedeutung von myeloid derived suppressor cells (MDSC) in der HIV- bzw. Hep C/B-Infektion

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig und Sie können Ihr Einverständnis jederzeit und ohne Angaben von Gründen zurückziehen, ohne dass Ihnen daraus ein Nachteil entsteht. Wenn Sie Ihre Einwilligung zurückziehen, werden alle Daten, die bis dahin erhoben wurden, vernichtet. Ebenso werden alle eingefrorenen Blutproben vernichtet.

Unterschriften:

Studienteilnehmer/in

Datum

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

Studienteilnehmer/in

Datum

Ich habe den Zweck dieser wissenschaftlichen Studie, den Studienablauf und die möglichen Risiken und eventuellen Vorteile, die mit dieser Studie verbunden sind, erklärt. Ich habe alle Fragen bezüglich dieser Studie nach bestem Wissen beantwortet.

Studienleiter/ behandelnder Arzt

Datum

Veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit

An dieser Stelle wird auf die bereits veröffentlichten Teile der vorliegenden Arbeit verwiesen.

Poster

Plagge J*, Arenz L*, Stirner R, Grützner E, Schrödl K, Berking C, Bogner JR, Draenert R; *equally contributed. Die Rolle von Interleukin-10 für den Wirkmechanismus von myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in der chronischen HIV-Infektion. (*Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Juni 2015, Düsseldorf*)

Publikation

In Vorbereitung.

Die Rolle von Interleukin-10 für den Wirkmechanismus von Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in der chronischen HIV-Infektion

Plagge J*, Arenz L*, Stirner R, Grützner E, Schrödl K, Berking C, Bogner JR, Draenert R

Sektion Klinische Infektiologie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU, München

*equally contributed

HINTERGRUND

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) sind eine Gruppe von unreifen, myeloiden Vorläuferzellen, die bei verschiedenen Erkrankungen (Malignome, chronisch virale Infektionen) T-Zell-Antworten unterdrücken. Unterteilt werden diese hauptsächlich in eine monozytäre (mMDSC) und eine granulozytäre (gMDSC) Subgruppe, deren genaue Wirkmechanismen im Menschen derzeit intensiv untersucht werden. Da das inhibitorisch wirkende Zytokin Interleukin-10 (IL-10) nachweislich im Plasma von chronisch HIV-infizierten erhöht ist, stellen wir die Hypothese auf, dass IL-10 auch für die Wirkmechanismen der MDSC-Subtypen eine Rolle spielen könnte.

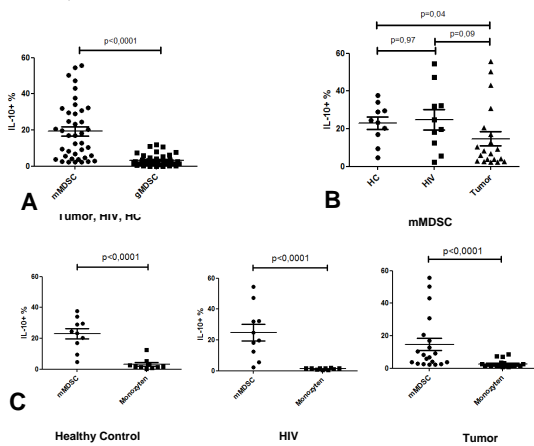


Abbildung 1:

IL-10 Produktion von mMDSC und gMDSC ex vivo

(A) Intrazelluläre Zytokininfärbung von PBMC: mMDSC produzieren im Vergleich zu gMDSC signifikant mehr IL-10. (B) Dabei ist die Produktion von IL-10 bei HIV-Patienten und HC vergleichbar. mMDSC von Malignom-Patienten hingegen produzieren weniger IL-10. (C) In allen drei Versuchsgruppen produzierten mMDSC im Vergleich zu Monozyten signifikant größere Mengen an IL-10.

HIV = HIV positiv, HAART-naiv (n=10)

Positivkontrolle = Tumorerkrankung (T3, T4), therapie-naiv (n=20) (NSCLC= 10, malignes Melanom = 4, SCLC= 1, HCC= 1, Mamma-Ca= 1, Pankreaskopf-Ca= 1, Trachea-Ca= 1, Zungen-Ca= 1)

Negativkontrolle = healthy controls (HC) (n=10)

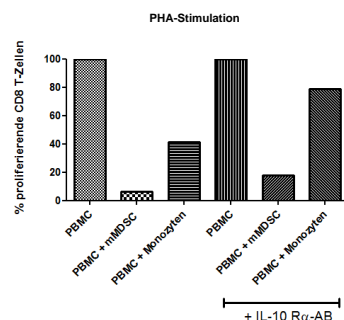


Abbildung 2:

Einfluss von IL-10 auf die proliferationshemmende Wirkung von mMDSC

Ko-Inkubationsassay von FACS-sortierten mMDSC (Tumor) oder FACS-sortierten Monozyten (Tumor) mit PBMC (HC) in An- und Abwesenheit eines IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers (IL-10-Rα-AB). Proliferationsstimulus war PHA. Read-out für Suppression war die Proliferation der CD8 T-Zellen. Die Proliferation der PBMC allein wurde auf 100% gesetzt. Die Proliferation mit mMDSC oder Monozyten wurde als Prozentsatz davon berechnet. mMDSC hemmen die CD8 T-Zell-Proliferation deutlich. Auch Monozyten weisen proliferationshemmende Eigenschaften auf, jedoch nicht in gleichem Ausmaß. Die Zugabe des IL-10-Rα-AB führte zu einer inkompletten Wiederherstellung der Proliferation der CD8 T-Zellen. Weitere Assays müssen dieses vorläufige Ergebnis jedoch noch bestätigen.

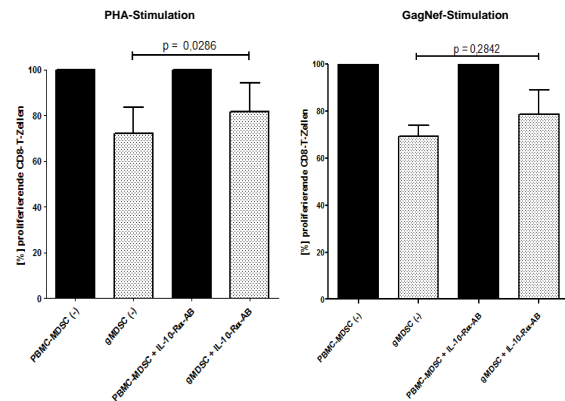


Abbildung 3:

Einfluss von IL-10 auf die proliferationshemmende Wirkung von gMDSC

Es wurden gMDSC von chronisch HIV-infizierten (n=11) isoliert und deren proliferationshemmende Wirkung auf CD8 T-Zellen von HIV-Controllen in vitro untersucht. Dazu führten wir Proliferationsassays durch und verwendeten zur Stimulation entweder PHA (n=6) oder einen GagNef-Pool (n=5). gMDSC hemmen die CD8 T-Zell-Proliferation signifikant. Die Zugabe des IL-10-Rα-AB führte zu einer leicht verbesserten Proliferation der CD8 T-Zellen – bei den PHA-Assays erreichte dies sogar statistische Signifikanz. Jedoch spielt IL-10 für die Wirkung der gMDSC – wenn überhaupt – nur eine untergeordnete Rolle. PBMC-MDSC (-) = PBMC-Rest nach MDSC-Isolation ohne Zugabe des IL-10 blockierenden Antikörpers. PBMC-MDSC + IL-10-AB = PBMC-Rest nach MDSC-Isolation mit IL-10 blockierendem Antikörper. gMDSC = Zugabe von isolierten gMDSC.

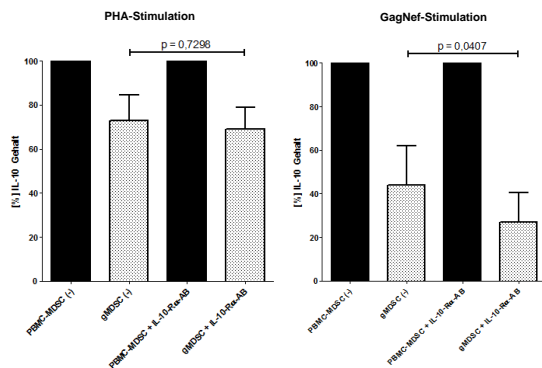


Abbildung 4:

IL-10 Gehalt in den zellfreien Überständen der Proliferationsassays

Wir bestimmten mit IL-10-ELISAs die Mengen an IL-10 in den Überständen der Proliferationsassays in An- und Abwesenheit des IL-10-Rα-AB. Hierbei fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Behandlung mit IL-10-Rα-AB. Bei der GagNef-Stimulation ergaben sich niedrigere Werte für die IL-10-Rα-AB behandelten Wells. PBMC-MDSC (-) = PBMC-Rest nach MDSC-Isolation ohne Zugabe des IL-10 blockierenden Antikörpers. PBMC-MDSC + IL-10-AB = PBMC-Rest nach MDSC-Isolation mit IL-10 blockierendem Antikörper. gMDSC = Zugabe von isolierten gMDSC.

FAZIT:

Obwohl gMDSC in sehr geringem Maße IL-10 produzieren, zeigen unsere Daten, dass es für die hemmende Wirkung auf CD8 T-Zellen eine untergeordnete Rolle spielt. mMDSC dagegen produzieren deutliche Mengen an IL-10 (signifikant mehr als Monozyten). Wir postulieren, dass es für den Wirkmechanismus der mMDSC eine wichtige Rolle spielt. Diese Daten tragen dazu bei, die Bedeutung der mMDSC in der Immunpathogenese von Erkrankungen zu klären.

Danksagung

Zu der erfolgreichen Anfertigung dieser Dissertation haben einige Personen wesentlich beigetragen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle umfassend bedanken.

Die Arbeit wurde an der Sektion für Klinische Infektiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik der LMU München erstellt. Für diese Möglichkeit bedanke ich mich bei dem Leiter der Abteilung, Prof. Dr. med. Johannes Bogner.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Prof. Dr. med. Rika Draenert, die bei Problemen zu jeder Zeit mit Rat und Hilfestellung zur Stelle war. Ich konnte stets auf ihren umfangreichen Wissensreichtum zurückgreifen und bekam problemlos neuen Input, wenn ich einmal ins Stocken geraten war. Darüber hinaus bin ich dankbar für die durchweg verständnisvolle Art, die mich während der gesamten Laborzeit begleitet und über manch schwierige Situation, auch privater Themen, hinweg geholfen hat.

Eine weitere Person, ohne die die Erstellung dieser Arbeit kaum denkbar gewesen wäre, ist die 'gute Seele' unseres Labors, Renate Stirner. Zu Beginn wurde ich von ihr enthusiastisch und geduldig in die mir völlig fremde Methodik eingeführt. Während der gesamten Arbeitsphase konnte ich bei methodischen oder technischen Fragestellungen stets auf Renates umgehende Unterstützung zählen. Darüber hinaus trug Renate wesentlich zum harmonischen, kollegialen und herzlichen Arbeitsklima bei, was das Arbeiten auch in kniffligen Zeiten positiv bereicherte.

Außerdem möchte ich meiner Arbeitskollegin Eva Grützner danken, welche ebenfalls durch kollegiale Hilfestellung und ihre humorvolle Art die Laborzeit nachhaltig zu einer positiven Erinnerung machte. Zudem danke ich Lukas Arenz für die tolle Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung.

Zuletzt geht mein großer Dank an meine Familie und Freunde, die mich zu jeder Zeit in meinem Handeln bestätigt und mir den Rücken gestärkt haben.

Lebenslauf

Eidesstattliche Versicherung

Plagge, Julia Euphemia Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema

**Untersuchung der Bedeutung von
Interleukin-10 für den Wirkmechanismus von
polymorphonuclear Myeloid-derived suppressor cells
(PMN-MDSC) in der chronischen HIV-1 Infektion**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.07.2018

Julia Plagge

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand/in